



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação,
caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de
ésteres terpênicos**

Douglas Weber

Florianópolis
Julho/2016

Douglas Weber

**Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação,
caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de
ésteres terpênicos**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis
Julho/2016

Douglas Weber

**Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação,
caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de ésteres
terpênicos**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Luiz Parize
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Dalila Venzke

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Florianópolis
julho/2016

*Dedico este trabalho à minha família,
especialmente aos meus pais Vilson e Neide
e à minha irmã Samara, por me apoiarem
e me amarem incondicionalmente.*

*Ao Allan, por me apoiar e
estar sempre presente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as coisas boas que Ele tem proporcionado na minha vida.

À minha família, pelo apoio, amor e acolhida durante todos estes anos.

Ao Prof. Alexandre Luis Parize e à Prof.^a Maria da Graça Nascimento, pelo apoio, amizade, paciência e dedicação em todas as etapas da elaboração deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química, por contribuírem para a minha formação.

Aos colegas do laboratório 301/306, pela amizade e ajuda nas atividades do laboratório.

Ao Samuel Hammes Clasen e à Katiuscia Vieira Jardim, por terem realizado as análises de FTIR, TGA e MEV.

Aos amigos que me acompanham desde o início da graduação, de modo especial à Stephani, pela amizade e cumplicidade de todos esses anos. A minha graduação não teria sido a mesma sem você.

À Salete, pela amizade e pelas horas de risadas que tivemos desde a época do PIBID.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer durante o meu intercâmbio, por terem feito parte de uma das experiências mais enriquecedoras que tive a oportunidade de ter.

Ao Allan, pelo carinho, paciência e cumplicidade.

À UFSC, pelo suporte institucional e espaço físico fornecido.

À Central de Análises, pelas várias análises realizadas.

Ao CNPq, INCT-Catálise e CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.

A Amano e Novozymes, pela doação das enzimas.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS	x
RESUMO	xi
 1. INTRODUÇÃO	 xii
 2. REVISÃO DA LITERATURA	 1
2.1. Biopolímeros	1
2.1.1. Quitina	1
2.1.2. Quitosana	2
2.1.2.1. Quitosana: reatividade e modificações químicas	4
2.1.2.2. Reações de reticulação envolvendo a quitosana	4
2.1.2.3. Reações de formação de bases de Schiff envolvendo a quitosana	5
2.1.2.4. Reticulação iônica da quitosana.....	6
2.2. Lipases	7
2.3. Imobilização de enzimas	8
2.4. Ésteres derivados de álcoois terpênicos	11
 3. OBJETIVOS.....	 13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
 4. METODOLOGIA.....	 14
4.1. Reagentes, solventes e enzimas	14
4.2. Determinação do grau de desacetilação da quitosana	14
4.3. Análise espectrofotométrica das lipases de <i>Rhizopus oryzae</i> e de <i>Burkholderia cepacia</i>	15
4.4. Preparação das microesferas de quitosana	15
4.5. Reticulação das microesferas de quitosana	15
4.5.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído	16
4.5.2. Reticulação da quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP)	17
4.6. Determinação de grupamentos amina livres na quitosana reticulada	17
4.7. Imobilização das lipases nos suportes polimérico	18
4.8. Caracterização dos suportes poliméricos	19
4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	19
4.8.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	19

4.9.Preparação e caracterização dos ésteres derivados dos álcoois terpênicos	20
--	----

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
--------------------------------	----

CAPÍTULO I: Preparação, caracterização e imobilização de lipases para uso em síntese orgânica dos suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído	22
--	----

5.1.Determinação do grau de desacetilação da quitosana	22
5.2.Preparação e morfologia dos suportes de quitosana/glutaraldeído	23
5.3.Caracterização das microesferas de quitosana reticulada com glutaraldeído	26
5.3.1.Espectroscopia de infravermelho para os suportes de quitosana/glutaraldeído sem e com lipase imobilizada	26
5.3.2.Determinação de grupamentos amina livres na quitosana	28
5.4.Determinação da porcentagem de imobilização (PI%) e da capacidade de imobilização da enzima (CI).....	30
5.5.Aplicação das lipases imobilizadas nos suportes de quitosana/glutaraldeído	32
5.5.1.Eficiência catalítica das lipases F-AP15 e LPS-SD imobilizadas em suportes de quitosana/glutaraldeído	33
5.5.2.Estudo da reticulação do suporte de quitosana/glutaraldeído	35
5.5.3.Influência do tempo na obtenção do éster acetato de geranoíla	35
5.5.4.Estudo do reúso dos suportes de quitosana/glutaraldeído	36
5.5.5.Caracterização do acetato de geranoíla por FTIR	37

CAPÍTULO II: Preparação, caracterização e imobilização de lipases para uso em síntese orgânica dos suportes de quitosana reticulada com TPP	39
---	----

5.6.Preparação e morfologia dos suportes de quitosana/TPP	39
5.7.Espectroscopia de infravermelho das microcápsulas de quitosana/TPP	41
5.8.Aplicação das lipase imobilizadas nos suportes de quitosana/TPP	42
5.8.1.Influência do tempo de reação	42
5.8.2.Influência da temperatura	43

5.8.3.Caracterização do acetato de citroneíla por RMN- ¹ H e FTIR	44
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8. ANEXOS	52
ANEXO I:Curvas de calibração para as lipases F-AP15 e LPS-SD.....	52
ANEXO II:Imagens adicionais das microesferas de quitosana úmidas (Microscópio ótico)	53
ANEXO III:Espectros de RMN- ¹ H do citrônolol e acetato de citroneíla	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Conversão da quitina em quitosana através da desacetilação.....	2
Figura 2 - Principais agentes reticulantes	5
Figura 3 -Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído	6
Figura 4 - Esquema de reticulação iônica do tripolifosfato de sódio (TPP) com a quitosana	7
Figura 5 - Métodos de imobilização de enzimas	9
Figura 6 - Exemplo de reação de transesterificação	11
Figura 7 - Exemplos de terpenos encontrados na natureza	12
Figura 8 - Estrutura química dos álcoois terpênicos geraniol e citrônolol.	12
Figura 9 - Representação esquemática da reação de reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído	16
Figura 10 - Representação esquemática da reação de ninidrina com quitosana	18
Figura 11 - Espectro de infravermelho da quitosana	23
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura para microesferas de quitosana secas e úmidas	25
Figura 13 - Microesferas de quitosana secas reticuladas por 6h com glutaraldeído 1,25% e 5%	26
Figura 14 - Espectros de infravermelho para as microesferas de quitosana pura e reticuladas com glutaraldeído 1,25% e 5,0%	27
Figura 15 - Espectros de infravermelho comparativos entre a quitosana pura, quitosana reticulada com glu 1,25%, quitosana reticulada com glu 1,25% + lipase LPS-SD e lipase LPS-SD pura	28
Figura 16 - Imobilização de LPS-SD em suportes de quitosana/glutaraldeído 1,25 e 5,0%	31
Figura 17 - Espectros de RMN- ¹ H do geraniol e acetato de geranoíla	34

Figura 18 - Influência do tempo de reação na síntese do acetato de geranoíla	36
Figura 19 - Reúso da lipase LPS-SD imobilizada no suporte quitosana/glutaraldeído 1,25%	37
Figura 20 - Espectro de FTIR para o acetato de geranoíla	38
Figura 21 - Microesferas de quitosana reticulada com TPP sem lipase e contendo a lipase LPS-SD imobilizada	39
Figura 22 - Espectros de EDS para as microesferas de quitosana reticuladas com TPP sem a lipase e contendo a lipase LPS-SD imobilizada	40
Figura 23 - Espectros de FTIR da quitosana pura, quitosana reticulada com TPP, quitosana com TPP contendo a lipase LPS-SD imobilizada e da lipase pura	41
Figura 24 - Influência do tempo de reação nos suportes de quitosana/TPP	42
Figura 25 - Influência da temperatura na síntese do acetato de geranoíla e acetato de citroneíla nos suportes de quitosana/TPP	44
Figura 26 - Espectro de FTIR para o acetato de citroneíla	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de grupamentos amina livres na quitosana reticulada com glutaraldeído	29
Tabela 2 - Porcentagem de imobilização (PI%) e CI das lipases F-AP15 e LPS-SD nos suportes de quitosana/glutaraldeído	32

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Preparação do acetato de geranoíla	20
Esquema 2 - Preparação do acetato de citroneíla	20

RESUMO

O uso de enzimas em sínteses e biotransformações, de modo geral, requer que as mesmas estejam imobilizadas em um suporte que permita a sua recuperação e a reutilização ao final de cada processo sintético. As lipases microbianas, por exemplo, são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as tornam muito atrativas para a aplicação industrial. Quando imobilizadas, suas propriedades e estabilidade são aumentadas consideravelmente, além do custo envolvido no processo ser mais reduzido. A partir destas considerações, neste trabalho foram preparados suportes poliméricos à base de quitosana para a imobilização de lipases de duas procedências diferentes, utilizando-se dois diferentes agentes reticulantes, o glutaraldeído e o tripolifosfato de sódio (TPP). Estes sistemas foram caracterizados por técnicas como espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura afim de se obter informações acerca do grau de desacetilação da quitosana (81%) e da estrutura física externa e interna das microesferas preparadas. Além disso, os suportes de quitosana/glutaraldeído e de quitosana/TPP foram utilizados na síntese de ésteres de aroma derivados dos álcoois terpênicos geraniol e citrionelol *via* reações de transesterificação. As conversões foram maiores ao usar os suportes reticulados com concentrações mais baixas (42%) do que concentrações mais altas (35%) do agente reticulante (glutaraldeído). As reações foram dependentes do tempo e a atividade catalítica da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) diminuiu, mantendo-se constante após cinco ciclos reacionais. De modo geral, os suportes preparados mostraram-se eficientes na imobilização de lipases, apresentando importantes aplicações na síntese orgânica.

Palavras-chave: *suportes poliméricos, quitosana, imobilização de lipases, síntese orgânica.*

1. INTRODUÇÃO

A química desempenha um importante papel em nossa sociedade devido, principalmente, aos inúmeros avanços por ela obtidos, como por exemplo, os diversos medicamentos, combustíveis e tantos outros materiais que foram obtidos para melhorar a qualidade e modo de vida da população de modo geral. No entanto, o desenvolvimento de métodos e procedimentos ambientalmente e, de certa forma, financeiramente favoráveis, vem se destacando no cenário científico. Dessa forma, a geração de subprodutos tóxicos e com grande poder de contaminação ambiental e de organismos vivos tem levado cientistas do mundo inteiro a estudar e desenvolver metodologias aplicáveis às ciências experimentais que se preocupam em reduzir e, idealmente, erradicar o uso de métodos e reagentes altamente contaminantes ou que gerem um número considerável de resíduos, sobretudo tóxicos e de difícil tratamento.

Assim, a biocatálise destaca-se como sendo uma área da química que vem se expandindo consideravelmente nos últimos anos e que se preocupa em tornar os processos sintéticos mais eficientes no que se refere à menor carga residual nociva produzida, assim como o uso cada vez mais frequente de rotas que empreguem, de modo satisfatório, substâncias de origem biológica. Nesse contexto, evidencia-se o uso de catalisadores biológicos, como as enzimas, e de biopolímeros, como a quitosana, na síntese de compostos orgânicos e inorgânicos. Aliando um ao outro, é possível o desenvolvimento de suportes poliméricos capazes de imobilizar, por meio de interações químicas, lipases de diferentes procedências para as mais variadas aplicações.

Nesse contexto, um dos objetivos deste trabalho foi a preparação de suportes à base do biopolímero quitosana capaz de imobilizar lipases. Estes suportes serão caracterizados para avaliar alguns parâmetros como eficiência de imobilização e interações lipase-suporte. Em seguida, os suportes foram utilizados na síntese de ésteres de aroma derivados dos álcoois terpênicos geraniol e citronelol *via* reações de transesterificação. Parâmetros como tempo de imobilização, tempo de reação, e reuso dos suportes foram avaliados durante a preparação dos acetato de geranoíla e de citroneíla.

Por meio deste trabalho, foi possível avaliar diferentes parâmetros para tornar os suportes poliméricos à base de quitosana cada vez mais eficientes, além de otimizar suas características afim de ampliar e estender suas aplicações para outros sistemas biocatalíticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros que podem ser obtidos ou produzidos por organismos vivos e isolados a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, e outras. O crescente interesse pelos biopolímeros está relacionado a alguns fatores de ordem socioeconômica e ambiental, tais como a escassez do petróleo e aumento de seu preço, assim como os grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para a produção dos polímeros derivados do mesmo.¹

Os biopolímeros e seus derivados constituem um grupo de compostos com características diversas, abundantes e de extrema importância para a vida. Eles apresentam propriedades fascinantes e oferecem as mais diversas aplicações. Organismos vivos são capazes de sintetizar uma grande variedade de polímeros, os quais podem ser divididos em proteínas e poli-aminoácidos; polissacarídeos como por exemplo celulose, amido, alginato, quitosana, xantana e carragena; e os poli-oxoésteres, como os poli-ácidos hidroxialcanóicos e poli-ácido maleico.² Destes, a quitina destaca-se por sua abundância e biodisponibilidade.

2.1.1. Quitina

A quitina, também denominada de 2-(acetamino)-2-desoxi-D-glicose, é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza depois da celulose. Apresenta uma estrutura semicristalina formada por uma rede de fibras altamente organizadas, sendo, portanto, responsável pela resistência e rigidez nos organismos em que está presente.

A quitina pode ser obtida a partir de diferentes fontes, sendo o exoesqueleto de artrópodes (insetos, crustáceos e aracnídeos) e moluscos a principal fonte de obtenção deste biopolímero. Além disso, diversos micro-organismos são capazes de produzir quitina, como algumas espécies de fungos e leveduras. As conchas de crustáceos como caranguejos e camarões

são as principais e mais importantes fontes de quitina devida, sobretudo, à facilidade de obtenção, já que são descartadas pela indústria pesqueira e de frutos do mar.³

A conversão dos grupos acetamido em grupos amino caracteriza o processo de desacetilação da quitina. Quando pelo menos 50% da cadeia polimérica da quitina encontra-se desacetilada esta passa a ser denominada de quitosana.⁴ A quitina, portanto, é a precursora da quitosana.

2.1.2. Quitosana

Um biopolímero que vem se destacando, sobretudo pelas suas propriedades e inúmeras aplicações, é a quitosana, um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4.⁵ A quitosana é obtida, majoritariamente, pela N-desacetilação da quitina, resultando na estrutura apresentada na **Figura 1**.

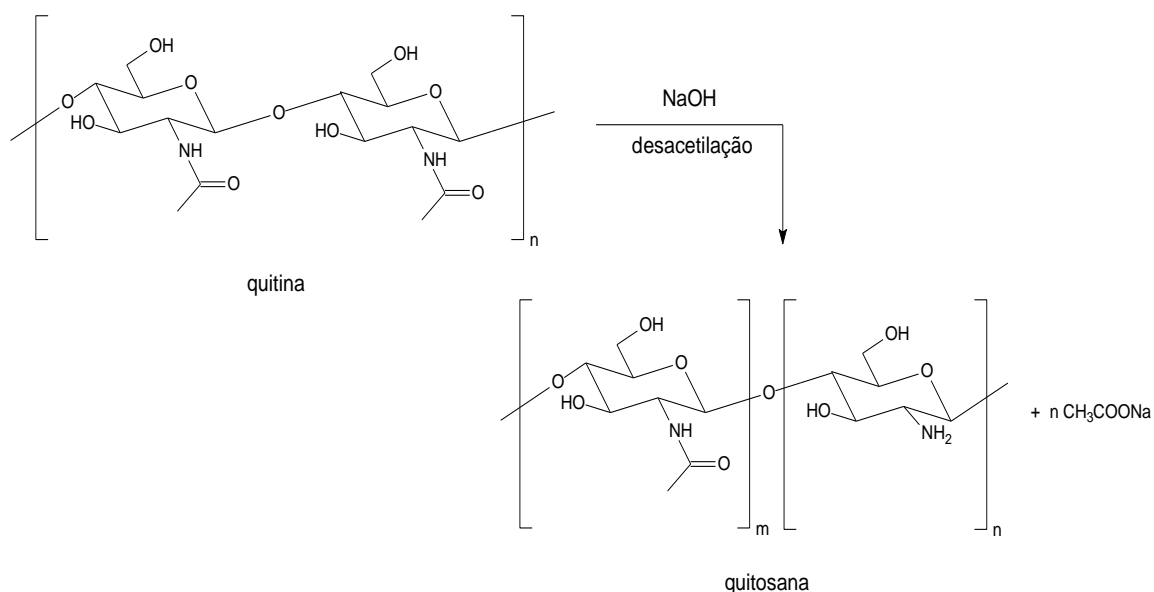


Figura 1. Conversão da quitina em quitosana através da desacetilação.

No processo de desacetilação, a quitosana é produzida a partir da quitina por hidrólise alcalina via processo termoquímico, que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40-50% m/m) à 110-115°C. Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e,

consequentemente, as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitam a despolimerização.^{6,7}

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois apresenta grupos aminas e hidroxilas reativos capazes de serem submetidos às modificações químicas. É solúvel em meios aquosos ácidos, pH inferiores à 6,2, sendo os ácidos acético, fórmico e cítricos os mais usados na solubilização do biopolímero. Quando dissolvida, possui carga positiva sobre os grupos amina (grupos -NH_3^+), o que facilita a sua solvatação em água. Além disso, a quitosana é capaz de aderir-se à superfícies carregadas negativamente, podendo agregar-se a compostos polianiónicos e a íons metálicos. Desta forma, tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto a agregação com poliânions atribuem propriedades e aplicações únicas à quitosana.^{8,9}

No que se refere às suas propriedades físico-químicas, este biopolímero pode variar em distribuição de massa molar, conteúdo de impurezas e em grau de desacetilação de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação. O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero. Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes reticulantes, solubilidade e viscosidade de suas soluções.^{9,10}

Ao longo das últimas décadas, a quitosana tem exibido potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de drogas, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis, esfera, micro/nanopartículas e membranas, pois combina propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, hidrofiliabilidade, atividade antifúngica, antiúlcera, antiácida, antimicrobiana, antibacteriana e é totalmente absorvível pelo organismo. Uma vez que a quitosana, apresenta alta densidade de grupos amina em sua estrutura, torna-se um sistema importante

para a adsorção e imobilização de enzimas, sendo que estas podem ser imobilizadas *via* adsorção ou reticulação química.¹¹⁻¹⁵

2.1.2.1. Quitosana: reatividade e modificações químicas

A quitosana possui uma cadeia constituída por diferentes grupos funcionais, os quais apresentam diferentes reatividades. Esses sítios reativos são bastante versáteis para modificações químicas, o que insere a quitosana em um grupo de biomoléculas com diversas aplicações nos mais variados ramos da ciência, uma vez que os seus derivados apresentam aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas. Dessa forma, a estrutura da quitosana pode ser manipulada e modificada por meio da inserção de novos grupos funcionais, conferindo aos seus derivados as características desejadas para as aplicações de interesse.¹⁵

Dentre as inúmeras reações possíveis envolvendo a quitosana destacam-se aquelas que ocorrem entre segmentos de uma mesma cadeia ou entre cadeias poliméricas vizinhas, como por exemplo as reações de reticulação e as de formação de base de Schiff.^{16,17}

2.1.2.2. Reações de reticulação envolvendo a quitosana

As reações de reticulação, também chamadas de reações de entrecruzamento, tem como objetivo a união das cadeias poliméricas da quitosana ou, ainda, a união de suas cadeias com às de outros polímeros, resultando na formação de cadeias poliméricas híbridas. Este procedimento visa promover uma série de modificações das propriedades do biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular. Esse procedimento ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da quitosana e alguns reagentes reticulantes.^{10,18}

Para agir como agente reticulante, no caso específico da quitosana, um reagente deve possuir funções químicas aptas a interagir com grupamentos amino, com hidroxilas ou com ambos os tipos de grupos presentes na estrutura

do biopolímero. Os agentes reticulantes mais conhecidos e encontrados na literatura são o glutaraldeído (1,5-pentanodial), o genipin, a epícloridrina e o tripolifosfato de sódio, sendo os três primeiros os mais usados.^{19,20} A estrutura química de cada um deles pode ser observada abaixo (**Figura 2**).

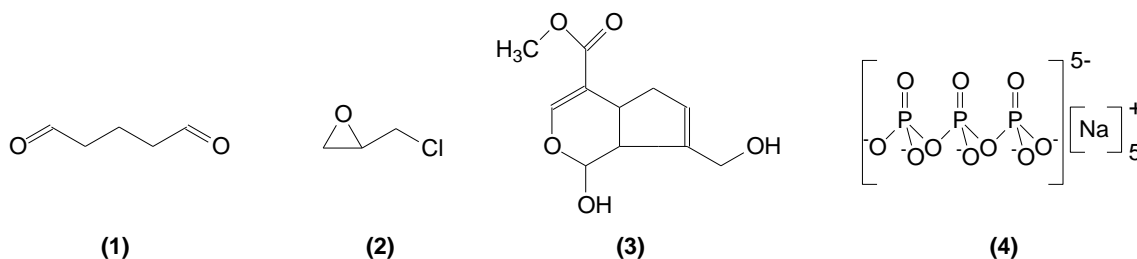


Figura 2. Principais agentes reticulantes: **(1)** Glutaraldeído; **(2)** Epícloridrina; **(3)** Genipin; **(4)** Tripolifosfato de sódio.

2.1.2.3. Reações de formação de base de Schiff envolvendo a quitosana

As bases de Schiff, também denominadas de iminas, são formadas pela condensação de uma amina primária com uma carbonila, sob condições específicas, formando as ligações C=N.²¹ A formação de ligação imínica nas cadeias da quitosana é possível através do emprego de aldeídos monofuncionais, como o formaldeído, ou bifuncionais, tais como o glicoxal e/ou o glutaraldeído, como agentes reticulantes. Nesse caso, a reação que ocorre entre os grupos amino e a carbonila aldeídica é uma adição nucleofílica. O par de elétrons não ligante no nitrogênio da amina ataca o carbono da carbonila, resultando na formação de uma ligação dupla entre o carbono do aldeído e o nitrogênio da quitosana.²²

Pelo fato de o glutaraldeído ser um agente reticulante bifuncional pode haver a formação de ligações cruzadas com duas unidades de quitosana para cada molécula de glutaraldeído na mesma cadeia polimérica ou não, conforme pode ser visto na **Figura 3**.

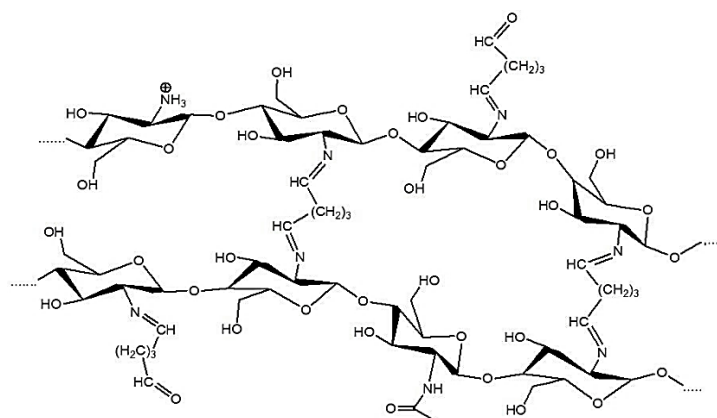


Figura 3. Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído.²³

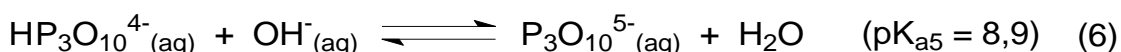
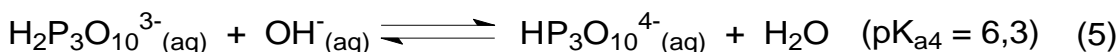
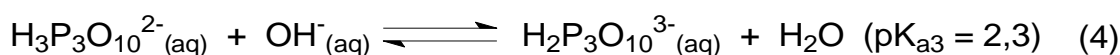
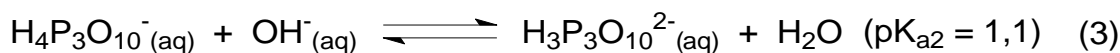
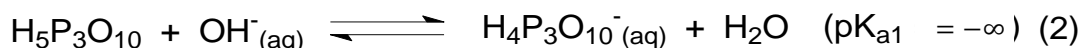
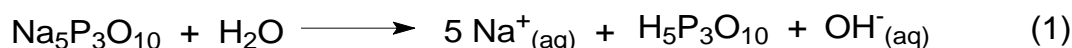
Através da reticulação com o glutaraldeído a quitosana pode ligar-se covalentemente aos resíduos de aminoácidos do centro ativo de enzimas, tais como as lipases. Dessa forma, a quitosana reticulada age como um suporte para a imobilização de enzimas, as quais podem ser empregadas como catalisadores na síntese orgânica.²⁴

2.1.2.4. Reticulação iônica da quitosana

Uma propriedade importante da quitosana é sua natureza policatiónica. Enquanto a maioria dos polissacarídeos possui caráter aniônico, a quitosana apresenta o caráter básico de uma amina, comportando-se como uma base fraca, com pK_a próximo a 6,5. Quando em solução aquosa diluída de ácido, em pH próximo a 3, os grupos $-NH_2$ da quitosana tornam-se totalmente protonados, formando um policátion.²⁵ Essa propriedade permite que a quitosana seja reticulada com agentes reticulantes iônicos, como por exemplo, o tripolisfosfato de sódio.

O tripolisfosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$) é apresentado na literatura como um reticulante não tóxico e alternativo para a preparação de micropartículas de quitosana. Este, por sua vez, apresenta em sua estrutura grupamentos $-PO_4^{3-}$ que são facilmente atraídos pelos grupamentos $-NH_3^+$ contidos na estrutura protonada da quitosana, ocorrendo assim uma aproximação das duas substâncias através de uma reticulação iônica.²⁶ Essa interação pode ser controlada pela densidade de cargas do TPP e da quitosana, a qual é dependente do pH da solução. Dessa forma, o TPP pode se dissociar em água

para gerar íons OH^- e trifosfóricos ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$), conforme descrito nas equações de dissociação abaixo:²⁷



A **Figura 4** esquematiza as interações iônicas resultantes da reticulação entre os grupos amino protonados da quitosana e os íons trifosfóricos do TPP.

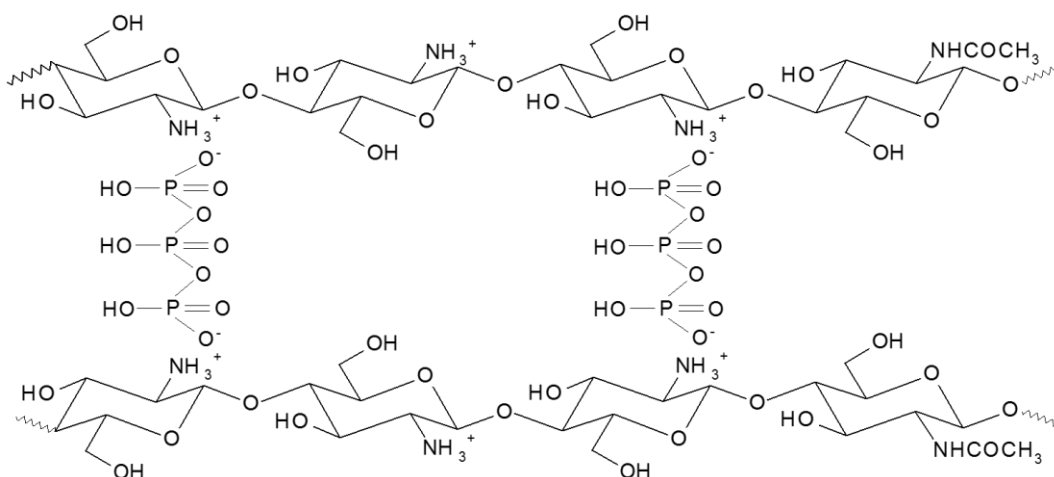


Figura 4. Esquema de reticulação iônica do tripolifosfato de sódio (TPP) com a quitosana.²⁷

2.2. Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas, podendo ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (fungos e bactérias) e vegetal, com diferentes propriedades catalíticas. São, em sua maioria, extracelulares, o que favorece sua extração, isolamento e purificação.^{28,29}

As lipases catalisam reações de hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Além disso, elas também atuam como catalisadoras de outras

reações, envolvendo outros substratos, como por exemplo, a hidrólise de álcoois de tamanhos de cadeia variados, além de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não-aquosos. A habilidade de catalisar diferentes tipos de reações envolvendo diferentes substratos é conhecida como promiscuidade ou versatilidade enzimática. A versatilidade das lipases tem recebido grande atenção nos últimos anos, sobretudo devido às inúmeras aplicações industriais.³⁰

As lipases possuem extrema importância na biotecnologia e na indústria. Nesse contexto, destacam-se a sua grande disponibilidade e baixo custo, além de atuarem em uma faixa de pH relativamente grande. Essa versatilidade faz com que as mesmas sejam uma ótima escolha na produção de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, têxteis e cosméticos, entre outros. Dentre as inúmeras aplicações das lipases, destaca-se a produção de ésteres de aroma e de fragrâncias, obtidos por meio de reações de esterificação ou transesterificação a partir de ácidos carboxílicos de cadeia curta, tais como o acético, butírico e propiônico, e de álcoois, como por exemplo, o geraniol, citronelol e o álcool isoamílico.^{31,32,33}

As lipases e as demais enzimas, de modo geral, são ativas também em ambiente hidrofóbicos com eficiência semelhante àquela encontrada em solução aquosa. No entanto, a atividade catalítica das enzimas está sujeita à inativação em meio orgânico por fatores químicos, físicos ou biológicos. Com o intuito de protegê-las das interações com o solvente, têm sido desenvolvidas diversas técnicas de imobilização de enzimas.³⁴

2.3. Imobilização de enzimas

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. Uma das principais vantagens dos processos de imobilização enzimática é o aumento do tempo de vida útil das enzimas, possibilitando o reúso das mesmas repetidas vezes. Ademais, as enzimas imobilizadas tem suas propriedades e atuação catalítica aumentadas, além de adquirirem maior estabilidade frente à variações de pH e temperatura.^{18,28,34}

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a enzima e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van de Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada.^{28,35} Esses métodos são sumarizados na **Figura 5**.

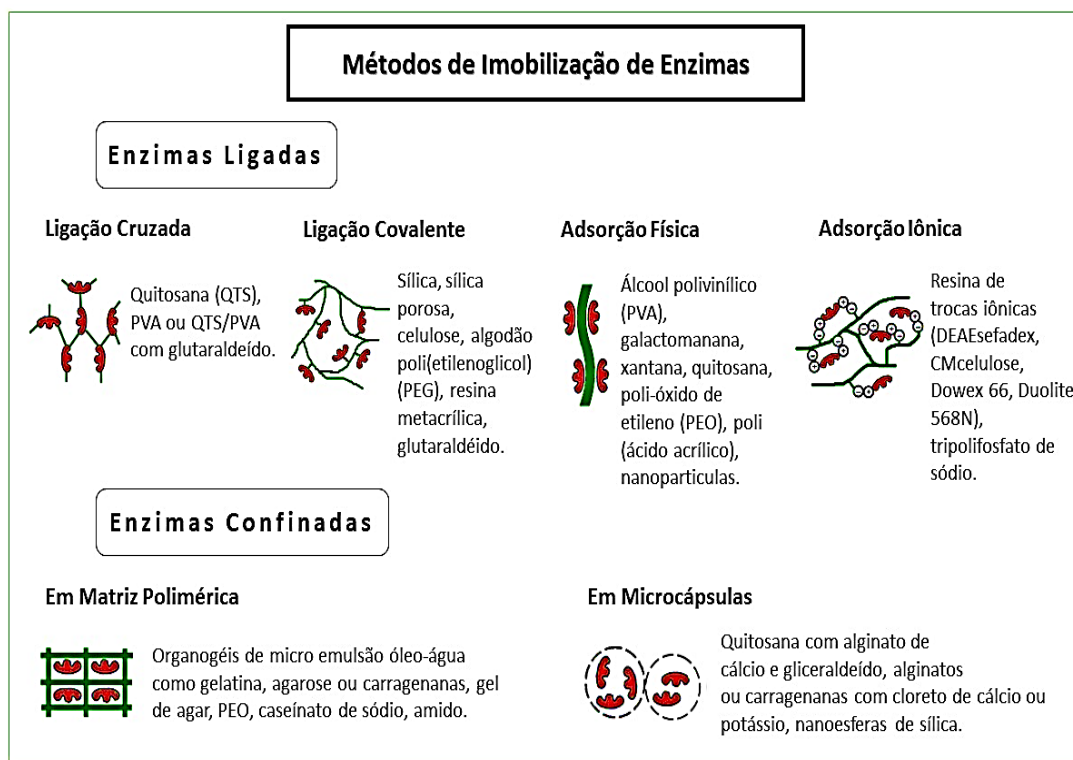


Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas.^{28,35}

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos em dois grupos: aqueles em que a enzima encontra-se ligada ao suporte por meio de interações de superfície ou por ligações químicas (iônica ou covalente), e aqueles em que a enzima encontra-se confinada no suporte, tais como o confinamento em matriz polimérica ou em microcápsulas.^{34,35}

Os métodos de confinamento em matriz polimérica e em microcápsulas não envolvem a formação de ligações químicas entre a enzima e o suporte. Na imobilização em matriz de gel, a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto. Por sua vez, a imobilização em microcápsula pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou

por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito.^{34,35}

Na imobilização por adsorção física, a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização. Na imobilização por adsorção iônica, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte, quanto da enzima. Essa união é mais efetiva que a adsorção física, mas é inferior quando comparada com outros métodos.³⁵

A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais utilizados e envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima. A imobilização por ligação cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais.^{34,35}

As aplicações de enzimas imobilizadas em diferentes tipos de suportes são de extrema relevância na produção de diversos tipos de substâncias químicas e biológicas. Do ponto de vista industrial, a imobilização tem como vantagens a possibilidade de uso contínuo e maior estabilidade da enzima, assim como o maior controle de etapas reacionais, sobretudo na separação do produto. Em contrapartida, as mudanças conformacionais da enzima, a transferência de massa e a baixa eficácia de substratos insolúveis são algumas das desvantagens do uso de enzimas imobilizadas.³⁶ O emprego de enzimas imobilizadas são vastos e de grande importância para a biotecnologia. Destacam-se, por exemplo, aplicações na produção de alimentos, cosméticos, detergentes, couros e panificação, entre outras.^{36,37}

2.4. Ésteres derivados de álcoois terpênicos

Os ésteres estão entre os mais comuns de todos os compostos de ocorrência natural. Muitos ésteres simples são líquidos à temperatura ambiente e apresentam odor agradável, os quais são responsáveis pela fragrância de flores e frutos. Eles também estão presentes em gorduras animais e em muitas moléculas biologicamente importantes, tais como os fosfolipídios.^{31,38}

Os ésteres podem ser preparados a partir de uma reação de substituição nucleofílica entre um éster e um álcool, num processo denominado de transesterificação. Nas reações de transesterificação, um éster e um álcool reagem para formar um novo éster e um novo álcool. A **Figura 6** mostra um exemplo de reação de transesterificação entre o benzoato de metila e o etanol, resultando na formação do benzoato de etila e metanol.²¹

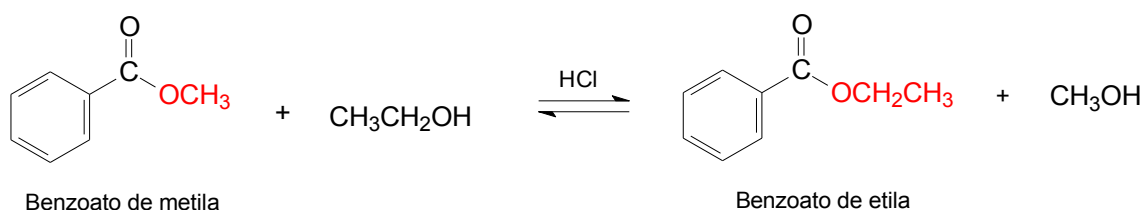


Figura 6. Exemplo de reação de transesterificação.

Devido à sua versatilidade, a reação de transesterificação tem papel importante na obtenção de vários insumos necessários à nossa sociedade atual, tais como polímeros e biocombustíveis, e é utilizada em muitos processos industriais conhecidos e explorados há muitos anos.³⁸

Os compostos terpenóides representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos e são produzidos por uma variedade de plantas, animais e microorganismos. Os terpenóides, também conhecidos como isoprenóides, são definidos como estruturas moleculares contendo esqueletos de carbono formado de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e incluem produtos de degradação de terpenóides em átomos de carbono que podem ter sido perdidas através de processos químicos e bioquímicos.^{39,40} Na **Figura 7** tem-se a estrutura de alguns compostos monoterpênicos.

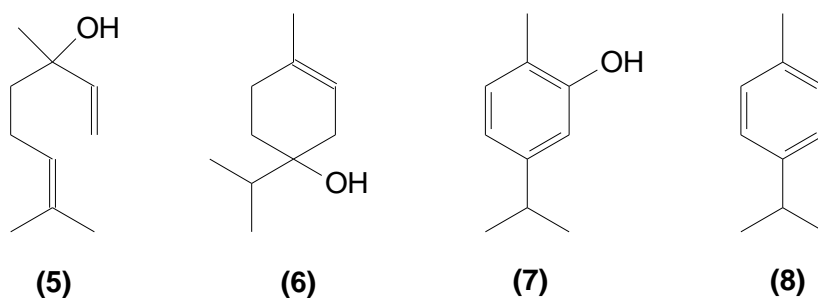


Figura 7. Exemplos de terpenos encontrados na natureza: **(5)** linalol, **(6)** terpinen-4-ol, **(7)** carvacrol e **(8)** *p*-cimeno.

Os compostos terpênicos constituem uma das maiores classes de produtos naturais encontrados na natureza, desempenhando inúmeras funções, tais como atrair insetos para promover a polinização das flores, repelente natural, proteção contra doenças, pigmentos naturais, entre outras.⁴¹ Monoterpenos são matérias-primas renováveis e de baixo custo. A química das indústrias de fragrâncias e de flavorizantes é essencialmente baseada nestes compostos. Ademais, aldeídos, álcoois e ésteres monoterpênicos quase sempre apresentam propriedades organolépticas interessantes e se constituem nos principais compostos usados na síntese de fragrâncias usadas atualmente.^{42,43}

Neste contexto, nesse trabalho foram utilizados dois álcoois terpênicos, o citronelol e o geraniol como precursores na síntese de ésteres de cadeia curta por meio de reações de transesterificação. **(Figura 8)**

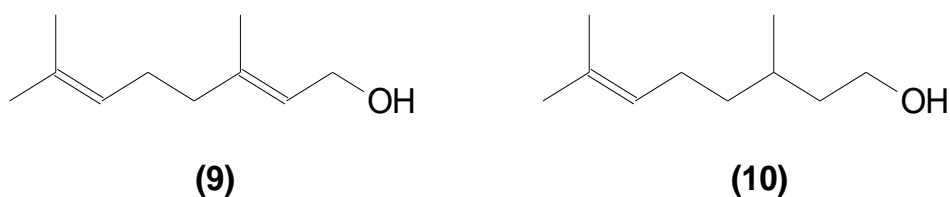


Figura 8. Estrutura química dos álcoois terpênicos **(9)** geraniol e **(10)** citronelol.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Preparar microesferas de quitosana a partir de diferentes processos de reticulação com a finalidade de imobilização de lipases de duas procedências diferentes e avaliar a sua atividade catalítica frente à preparação de ésteres derivados do geraniol e citronelol.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Preparar suportes poliméricos para imobilização de lipases, tais como as micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e com TPP;
- ✓ Caracterizar os suportes poliméricos preparados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Avaliar a eficiência do suporte preparado quanto à imobilização de lipases e sua posterior recuperação para uso contínuo;
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas imobilizadas para catalisar reações de transesterificação de álcoois terpênicos, tais como o citronelol e o geraniol, com acetato de vinila, em função do tempo de imobilização, tempo de reação e estabilidade frente ao reuso em mais de um ciclo reacional;
- ✓ Purificar e caracterizar, por técnicas espectroscópicas de infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), os ésteres preparados;
- ✓ Avaliar a reutilização da lipase LPS-SD imobilizada após a síntese do acetato de geranoíla;
- ✓ Comparar estes dados com os publicados na literatura.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes, solventes e enzimas

Os reagentes, solventes e lipases que serão utilizados neste trabalho são: quitosana de massa molar média $122,3 \text{ kg.mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 99%), ácido acético (Vetec, 99,7%), glutaraldeído (Vetec, 50%), hidróxido de sódio (Vetec, P.A.), ninidrina (Sigma-Aldrich), etilenoglicol (Merck), geraniol (Sigma-Aldrich, 99%), citronelol (Aldrich, 95%), acetato de vinila (Vetec, 99%), tampão tris (Sigma-Aldrich, 99,9%), etanol absoluto (Cromato Produtos Químicos Ltda, 99,5%), hexano (Synth, 98,5%), diclorometano (Synth, 99,5%), acetato de etila (Grupo Química, 99%), clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Cambridge Isotope Laboratories, 99,8%)

Foram utilizadas as seguintes lipases: lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) (Novozymes, 150 u/mg^*) e lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) (Amano, 23.000 U/g^{**});

* Quantidade de enzima necessária para liberar $1,0 \mu\text{mol/min}$ de ácidos graxos do óleo de oliva, à pH 7,0 e 30°C .⁴⁴

** Quantidade necessária para liberar $1,0 \mu\text{mol/min}$ de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do álcool 1-feniletílico com acetato de vinila à 25°C .⁴⁴

4.2. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por espectroscopia no infravermelho pelo método descrito por BRUGNEROTTO *et al.*, 2001.⁴⁵

O espectro de infravermelho de amostras sólidas de quitosana, na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, foi realizado em pastilhas de KBr com resolução de 4 cm^{-1} , por meio da acumulação de 32 escaneamentos em um espectrômetro IR Prestige-21 Shimadzu.

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado pela **Equação 1**;

$$\%GD = 100 - \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0,3822}{0,03133} \quad \text{Equação 1}$$

onde %GD é o grau de desacetilação; e A_{1320} e A_{1420} são as intensidades de absorção no infravermelho em 1320 e 1420 cm^{-1} , respectivamente.

4.3. Análise espectrofotométrica das lipases de *Rhizopus oryzae* e de *Burkholderia cepacia*

Neste estudo foram utilizadas as lipases de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) e de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) para a avaliação da imobilização das mesmas nos diferentes suportes.

Foram preparadas curvas de calibração de cada uma das lipases usadas para a determinação da eficiência de imobilização nos suportes. Soluções padrão de F-AP15 e LPS-SD foram preparadas por meio da diluição de uma solução estoque de concentração 7 g/L da enzima em solução tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) de $\text{pH} \cong 7,2$. A curva de calibração para a F-AP15 foi preparada por meio de espectroscopia de UV-Vis (8452A Diode Array Spectrophotometer) na região do visível, em 280 nm e, para a LPS-SD, no comprimento de onda de 210 nm.

As curvas de calibração encontram-se no **Anexo I**.

4.4. Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 2g de quitosana em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2% (v/v), mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 2% (m/v) de quitosana. Em seguida, a solução foi gotejada lentamente (gotejador Roger R-100EC), por meio de um capilar, em uma solução de NaOH 2 mol.L^{-1} . Através do fenômeno de separação de fases ocorreu a precipitação das microesferas. As microesferas gelificadas foram deixadas em contato com a solução de precipitação por 30 minutos, filtradas, lavadas com água destilada até pH 7,0 e secas à temperatura ambiente.

4.5. Reticulação das microesferas de quitosana

Neste trabalho, efetuou-se a imobilização de lipases nos suportes poliméricos pelo método da ligação, tanto por ligação covalente quanto por adsorção física da enzima no suporte. Dessa forma, as microesferas de quitosana foram reticuladas com soluções aquosas de glutaraldeído em duas concentrações diferentes. Variaram-se também a temperatura e tempo nas reações de reticulação e de imobilização das lipases.

4.5.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído

As reações de reticulação da quitosana com glutaraldeído foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento:

Prepararam-se duas soluções aquosas de glutaraldeído, sendo uma de concentração 1,25% (v/v) e a outra de 5,0% (v/v). Em seguida, adicionou-se cerca de 300 mg de microesferas secas de quitosana a 25 mL de cada uma das soluções de glutaraldeído e deixou-se o sistema sob agitação constante, à 30°C, por 6h. O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se um tempo de reação de 12h. Ao final da reação, o excesso de glutaraldeído foi lavado com água destilada e as microesferas foram secas à temperatura ambiente. A representação esquemática da reação de reticulação pode ser observada na

Figura 9.

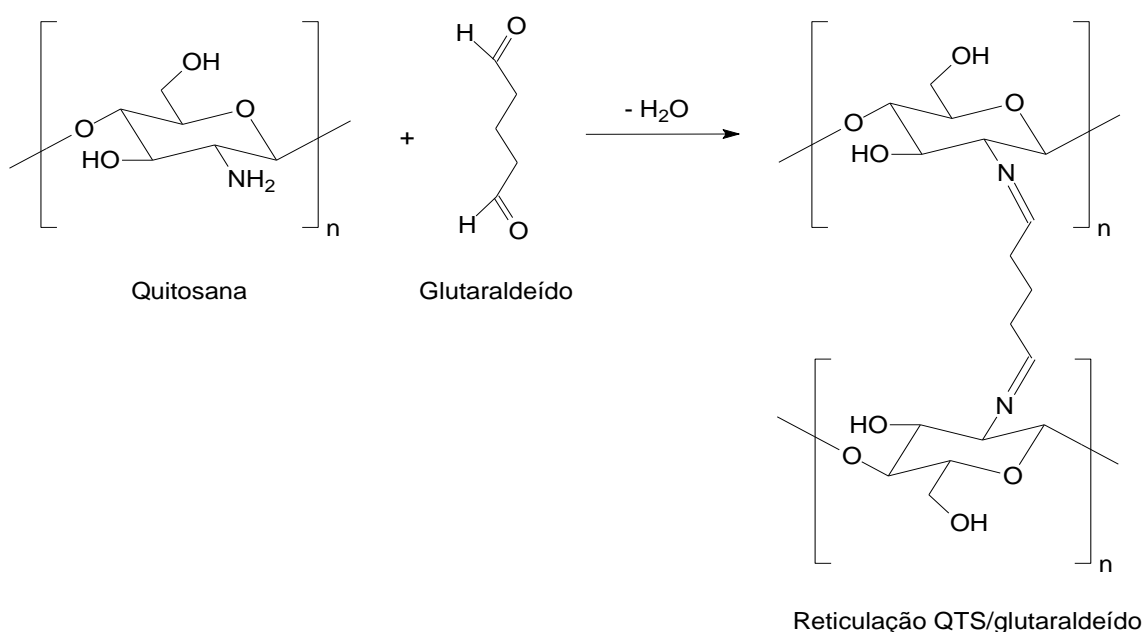


Figura 9. Representação esquemática da reação de reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído.

Utilizou-se o mesmo procedimento para a reticulação das esferas úmidas, porém, sem a etapa de secagem.

4.5.2. Reticulação da quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP)

A reticulação iônica da quitosana com TPP foi realizada seguindo-se o seguinte procedimento:

Uma solução de quitosana 2% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 2 g de quitosana em 100 mL de uma solução aquosa 2% (v/v) de ácido acético, mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução. Em seguida, adicionou-se 40 mg de lipase (dissolvida em uma pequena quantidade de solução tampão) para cada 10 mL de solução de quitosana, sob agitação constante. Posteriormente, a solução foi gotejada lentamente (gotejador Roger R-100EC), por meio de um capilar, em uma solução aquosa 2,5% (m/v) de TPP preparada em tampão fosfato de potássio com $\text{pH} \approx 7,2$. Observou-se a formação de microesferas, as quais foram deixadas em contato com a solução de precipitação por 30 minutos, filtradas, lavadas com água destilada e armazenadas em solvente orgânico (*n*-hexano) na geladeira. Nos suportes preparados por meio da reticulação iônica da quitosana com TPP a imobilização da lipase LPS-SD ocorreu concomitantemente à formação das microesferas. A representação esquemática da reticulação da quitosana com TPP pode ser vista na **Figura 4** (Ver item 2.1.2.4).

4.6. Determinação de grupamentos amina livres na quitosana reticulada

A determinação dos grupamentos amino livres na superfície das micropartículas de quitosana após a reação de reticulação com glutaraldeído foi determinada por ensaio com ninidrina, segundo a metodologia descrita a seguir.

A solução de ninidrina foi preparada da seguinte maneira: Solução A: 1 mL de ácido acético, 10 mL ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) de NaOH e 0,04 g de SnCl_2 foram misturados a 25 mL de água destilada e mantida sob agitação mecânica por 30 minutos. Solução B: 1 g de ninidrina ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) foi adicionado a 25 mL de etileno glicol e mantida sob agitação mecânica até a completa solubilização da

ninidrina. As duas soluções A e B foram misturadas e mantidas sob agitação mecânica durante 45 minutos e, em seguida, armazenada em um frasco âmbar na geladeira.

Para o ensaio, pesou-se cerca de 4 mg de micropartículas de quitosana reticuladas e não-reticuladas. Estas foram colocadas em tubos de ensaio com 8 mL da solução de ninidrina (pH 3,5), à uma temperatura de 100°C, durante o período de 20 minutos. O produto foi filtrado e resfriado até a temperatura ambiente e, posteriormente, foi analisada por espectroscopia UV-Vis com um comprimento de onda fixado em 570 nm. A **Figura 10** mostra uma representação esquemática da reação entre a ninidrina e a quitosana para a formação de um composto colorido (Púrpura de Rühmann).

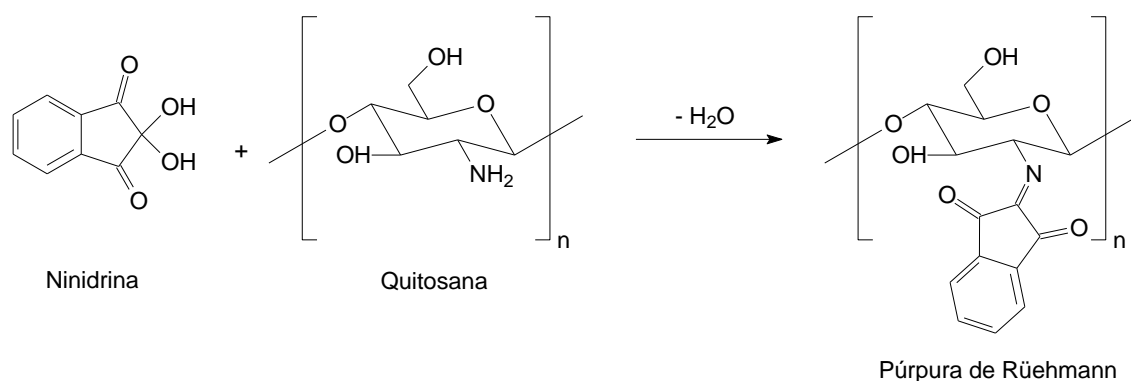


Figura 10. Representação esquemática da reação de ninidrina com quitosana.

A porcentagem de grupamentos amina livre das microesferas após a reticulação foi obtido por meio da **Equação 2**.

$$\% \text{ grupamentos amina livre} = \frac{A_{\text{reticulada}}}{A_{\text{não-reticulada}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde $A_{\text{reticulada}}$ é a absorvância de grupamentos amina livres de partículas reticuladas e $A_{\text{não-reticulada}}$ é a absorvância de grupamentos amina livres de partículas não reticuladas. A análise foi realizada em triplicata.

4.7. Imobilização das lipases nos suportes poliméricos

Aproximadamente 40 mg das lipases F-AP15 ou LPS-SD foi dissolvida em 10 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH= 7,2) e, então, deixadas

em contato, sem agitação e na geladeira, com as microesferas de quitosana reticuladas (secas e úmidas) por um período de tempo que variou de 24 a 72h. Em tempos pré-determinados, o sobrenadante das soluções foi analisado por espectroscopia UV-Vis, no comprimento de onda máximo de cada lipase, a fim de avaliar a eficiência de imobilização (PI%) e a capacidade de imobilização da enzima (CI). Estes parâmetros foram calculados pelas **Equações 3 e 4**⁴⁶.

$$PI (\%) = \frac{E_0 - E}{E_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$CI (g^{-1}) = \frac{E_0 - E}{w} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

4.8. Caracterização dos suportes poliméricos

Os suportes poliméricos preparados foram caracterizados utilizando-se duas técnicas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

4.8.1. Microscopia eletrônico de varredura (MEV)

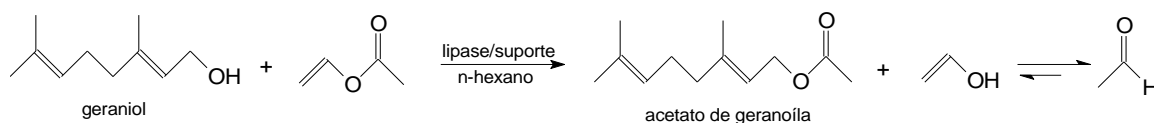
A morfologia interna e externa, porosidade e tamanho médio das microesferas de quitosana pura e reticuladas foram determinadas empregando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram colocadas em estabes, recobertas com ouro e micrografadas. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir da média de uma população de microesferas, utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal com o software *Image J*. As amostras foram analisadas empregando um microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG) marca JEOL modelo JSM-7001F, acoplado a um analisador de energia dispersiva de raios-X (EDS), localizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB).

4.8.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

As amostras de microesferas de quitosana pura e reticuladas com glutaraldeído foram pulverizadas para a análise. O espectro de infravermelho foi obtido na região de 4000 – 400 cm⁻¹ com um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (laboratórios 202/204 do Departamento de Química da UFSC), utilizando-se pastilhas de KBr, com resolução de 4 cm⁻¹ e pela acumulação de 32 escaneamentos.

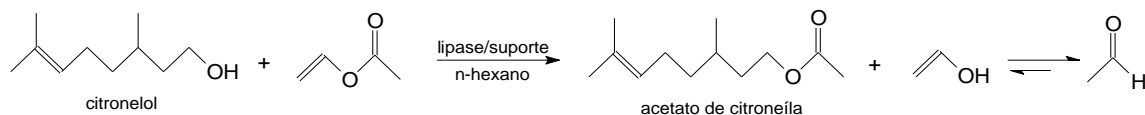
4.9. Preparação e caracterização dos ésteres derivados de álcoois terpênicos

Para as reações de transesterificação do geraniol adicionou-se em um erlenmeyer de 125 mL n-hexano (25 mL), geraniol (1,7 mL, 10 mmol), acetato de vinila (0,90 mL, 10 mmol), e a lipase (F-AP15 ou LPS-SD) imobilizada nos diferentes suportes poliméricos. A mistura reacional foi mantida a 35 °C, por 24 a 96h, em banho termostatzado (Technal TE-0532). **(Esquema 1)**



Esquema 1. Preparação do acetato de geranoíla.

Para as reações de transesterificação do citrônolol adicionou-se em um erlenmeyer de 125 mL, n-hexano (25 mL), geraniol (1,8 mL, 10 mmol), acetato de vinila (0,90 mL, 10 mmol), e a lipase (F-AP15 ou LPS) imobilizada nos diferentes suportes poliméricos. A mistura reacional foi mantida a 35 °C, por 24 a 96h, em banho termostatzado. **(Esquema 2).**



Esquema 2. Preparação do acetato de citroneíla.

As reações foram acompanhadas, periodicamente, por cromatografia de camada delgada (ccd), utilizando-se como eluente *n*-hexano:acetato de etila

(7:3 v/v). Os Rf's para os compostos foram calculados. Os valores encontrados para os acetatos de geranoíla e citroneíla foram 0,70 e 0,64, respectivamente.

Após o término das reações, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e o suporte lavado com solvente por diversas vezes, até que todos os reagentes e produtos fossem retirados do mesmo (acompanhado por ccd).

Cessada as lavagens, os suportes com as lipases foram guardados em pequenos frascos fechados contendo *n*-hexano e estocados em geladeira (10-15 °C). O solvente contendo o produto foi evaporado no rota-evaporador (Buchi 461 water bath) e, em seguida, estes foram quantificados por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) (Varian AC 400F, 400MHz, localizado na Central de Análises) por comparação da área dos hidrogênios metilênicos vizinhos da função álcool com os do éster (4,1 e 4,6 ppm, respectivamente, para o geraniol e acetato de geranoíla e 3,9 e 4,1 ppm, respectivamente, para o citronelol e acetato de citroneíla).

Outro método empregado para verificar a formação dos ésteres foi através da análise por espectroscopia de infravermelho (IV). As amostras foram colocadas entre duas placas de silício e analisadas no espectrofotômetro de infravermelho, com resolução de 4 cm⁻¹ e acúmulo de 32 escaneamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram preparados diferentes suportes poliméricos à base de quitosana para serem empregados na imobilização de lipases. As lipases imobilizadas, então, foram usadas como catalisadoras na síntese de ésteres terpênicos *via* reações de transesterificação.

Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos separadamente em dois capítulos, sendo cada um referente à um tipo de suporte preparado. Dessa forma, os capítulos I e II tratam dos seguintes tópicos:

- **Capítulo I:** Preparação, caracterização e aplicações na imobilização de lipases do suporte de quitosana reticulada com glutaraldeído.
- **Capítulo II:** Preparação, caracterização e aplicações na imobilização de lipases do suporte de quitosana reticulada ionicamente com TPP.

CAPÍTULO I: Preparação, caracterização e imobilização de lipases para uso em síntese orgânica dos suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído

Neste capítulo, serão discutidos os resultados obtidos referentes ao suporte de quitosana reticulada com glutaraldeído. Este, por sua vez, foi preparado de duas formas diferentes. No suporte (I), as microesferas de quitosana foram preparadas e, posteriormente, secas antes de serem reticuladas; e no suporte (II), as microesferas de quitosana foram mantidas úmidas e, então, reticuladas com glutaraldeído. Ambos os suportes foram usados para a imobilização de lipases para aplicações em síntese orgânica.

5.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por espectroscopia de infravermelho, cujo espectro obtido encontra-se na **Figura 11**.

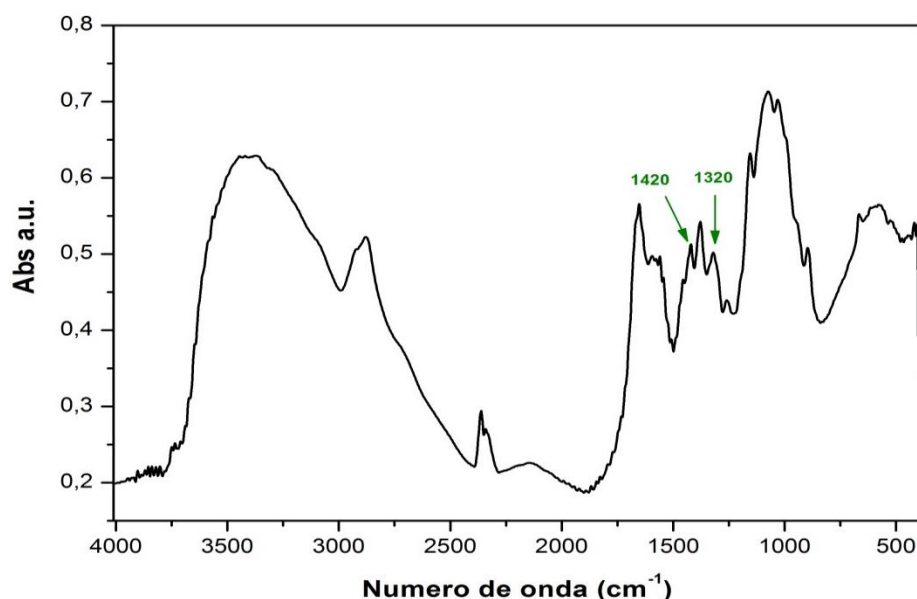


Figura 11. Espectro de infravermelho da quitosana. (KBr)

Muitas bandas características podem ser observadas neste espectro, tais como: uma banda larga entre 3700 e 3000 cm^{-1} relacionada aos estiramentos das ligações O-H e N-H; duas bandas, sendo uma em 2927 e outra em 2877 cm^{-1} , referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 . Observam-se, também, uma banda em 1652 cm^{-1} relacionada ao estiramento de carbonila de amida, uma em 1590 cm^{-1} característico de deformação angular (fora do plano) de $-\text{NH}_2$, e em 1418 e em 1379 cm^{-1} relacionados à deformação angular de $-\text{OH}$ e $-\text{CH}$ do anel glucosamídico. As bandas em 1251 e 900 cm^{-1} são características do estiramento de C-O do anel glucosamínico.⁴⁷

Por meio da **Equação 1** pôde-se determinar o grau de desacetilação da quitosana, sendo as absorvâncias em 1320 e 1420 cm^{-1} iguais a 0,5019 e 0,5126, respectivamente. Estas bandas estão relacionadas com a deformação angular de C-H do anel glicosídico e com a deformação angular de O-H, respectivamente.

$$\%GD = 100 - \frac{\left(\frac{0,5019}{0,5126} \right) - 0,3822}{0,03133} = 80,95 \%$$

Portanto, o grau de desacetilação da quitosana é, aproximadamente, 81%.

5.2. Preparação e morfologia dos suportes de quitosana/glutaraldeído

As microesferas de quitosana foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.5. Após neutralizadas, elas foram deixadas secar em temperatura ambiente por 2 dias. Depois de secas, as mesmas foram reticuladas com glutaraldeído por 6 ou 12h. Em alguns testes, realizou-se o procedimento de imobilização das lipases concomitantemente ao procedimento de reticulação. Em outros, realizou-se a imobilização após a reticulação por meio de impregnação da lipase no suporte, sem agitação e na geladeira. As microesferas úmidas, por sua vez, foram preparadas seguindo o mesmo procedimento, porém, sem a etapa de secagem. Depois de neutralizadas, elas foram reticuladas com glutaraldeído por 6h e, então, armazenadas em *n*-hexano na geladeira.

Observou-se uma mudança de coloração das microesferas reticuladas em comparação das não-reticuladas. Aparentemente, as microesferas secas não se tornaram mais frágeis e nem perderam sua consistência física após a reticulação. Já as microesferas úmidas tornaram-se mais frágeis após a reticulação, perdendo a resistência mecânica. A microscopia eletrônica de varredura forneceu informações sobre as características morfológicas das microesferas, tais como a presença de fissuras e poros. Pode-se verificar também, a partir do MEV, a homogeneidade do tamanho das microesferas formadas. As imagens obtidas por microscopia eletrônica das microesferas de quitosana permitiram a visualização de partículas densas com formato esférico. **(Figura 12)**

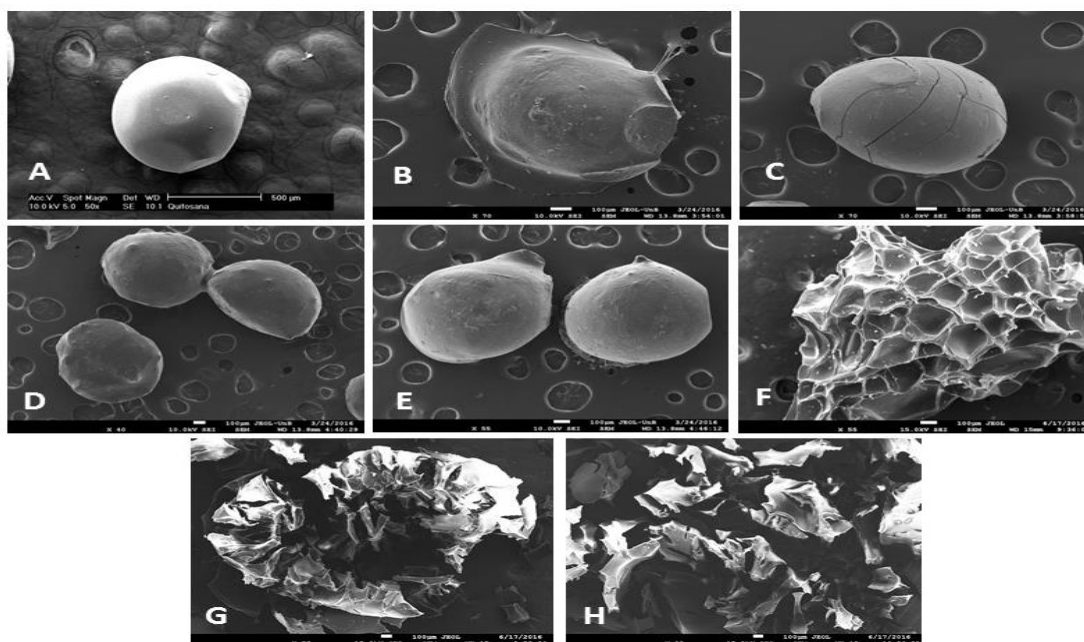


Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura para microesferas **(I) secas** de quitosana (A– quitosana pura; B– quitosana reticulada por 6h com glutaraldeído 1,25%; C- quitosana reticulada por 6h com glutaraldeído 5%; D- quitosana reticulada por 12h com glutaraldeído 1,25%; E- quitosana reticulada por 12h com glutaraldeído 5%) e **(II) úmidas** (F – quitosana pura; G – quitosana reticulada por 6h com glutaraldeído 1,25%; H – quitosana reticulada por 6h com glutaraldeído 5%).

O tamanho médio das microesferas secas foi de 650 a 850 μ m, dependendo da preparação e do tratamento químico realizado. Observou-se que as microesferas secas ficaram mais enrugadas e/ou com irregularidades na superfície após reticuladas, resultado da interação entre o biopolímero e o agente reticulante. As microesferas úmidas de quitosana são altamente porosas, mas quando reticuladas, tornam muito frágeis e por isso, são de difícil manuseio. No **Anexo II**, encontram-se outras imagens das microesferas úmidas obtidas a partir de um microscópio ótico, onde pode-se notar claramente as rugosidades e poros na superfície das esferas.

É possível inferir, a partir destas observações, que a reticulação ocorreu de modo eficiente tanto para as microesferas secas quanto para as úmidas e que a quitosana interagiu de forma diferente com o agente reticulante, dependendo da concentração em que este se encontrava. As microesferas secas reticuladas com solução de glutaraldeído de concentração 1,25% (v/v) apresentaram coloração mais intensa do que as que foram reticuladas com

solução de glutaraldeído cuja concentração era 5% (v/v), como pode ser visualizado na **Figura 13**.

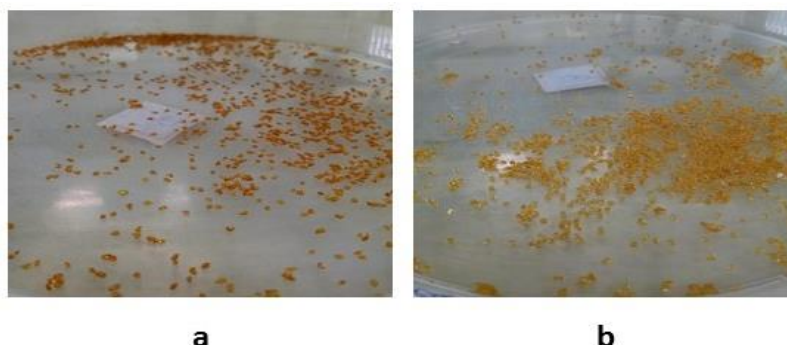


Figura 13. Microesferas de quitosana secas reticuladas por 6h com glutaraldeído 1,25% **(a)** e 5% **(b)**.

5.3. Caracterização das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído

As microesferas de quitosana secas foram submetidas às reações de reticulação com o glutaraldeído conforme os procedimentos descritos em **4.6.1**. Inicialmente, as mesmas foram preparadas utilizando-se o procedimento 1. Sendo assim, todos os testes de caracterização dos suportes e grande parte das reações de transesterificação foram realizadas utilizando as microesferas reticuladas de acordo com este procedimento. Posteriormente, alguns suportes foram preparados de acordo com os procedimentos 2 e 3, e estes foram diretamente aplicados na síntese de ésteres terpênicos por não apresentarem muitas diferenças funcionais.

Para caracterizar estes suportes foram realizadas uma série de testes e análises de caracterização, tais como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, a determinação de grupamentos amina livres por meio do teste de ninidrina, e a análise termogravimétrica.

5.3.1. Espectroscopia de infravermelho para os suportes de quitosana/glutaraldeído sem e com lipase imobilizada

As microesferas de quitosana pura e as reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído por 6h foram analisadas espectroscopicamente

na região do infravermelho (FTIR). Os espectros sobrepostos podem ser observados na **Figura 14**.

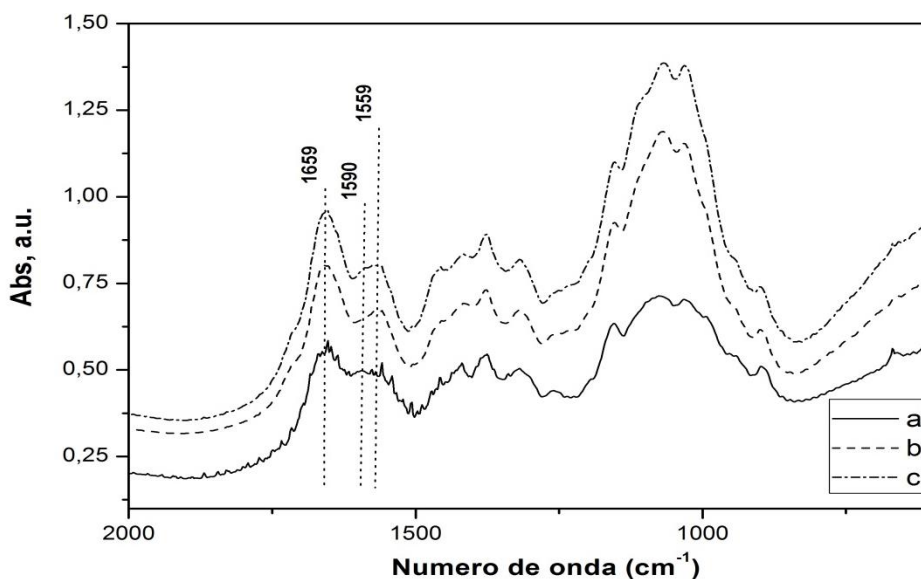


Figura 14. Espectros de infravermelho para as microesferas de quitosana: (a) pura, (b) reticulada com glutaraldeído 1,25% e (c) reticulada com glutaraldeído 5,0%. (KBr)

A partir da análise da **Figura 14**, observa-se no espectro das microesferas reticuladas a presença de uma nova banda em 1559 cm⁻¹, referente à formação da ligação C=N entre a quitosana e o glutaraldeído, indicando a ocorrência do processo de reticulação. Observa-se que a banda referente ao grupo amino (1590 cm⁻¹) não está presente nas microesferas reticuladas. Outra banda que surge é em 1659 cm⁻¹, que se refere à carbonila de aldeído proveniente do glutaraldeído. Este fato indica que estes grupos ainda estão presentes e podem servir na imobilização química da lipase nas microesferas. O mesmo comportamento foi observado para as microesferas reticuladas com glutaraldeído 1,25% e 5% por 12h.

Os suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído 1,25% contendo a lipase LPS-SD imobilizada por impregnação também foram analisados por FTIR. A **Figura 15** mostra o espectro obtido em comparação com os da quitosana pura e quitosana reticulada com glutaraldeído 1,25%, sem lipase.

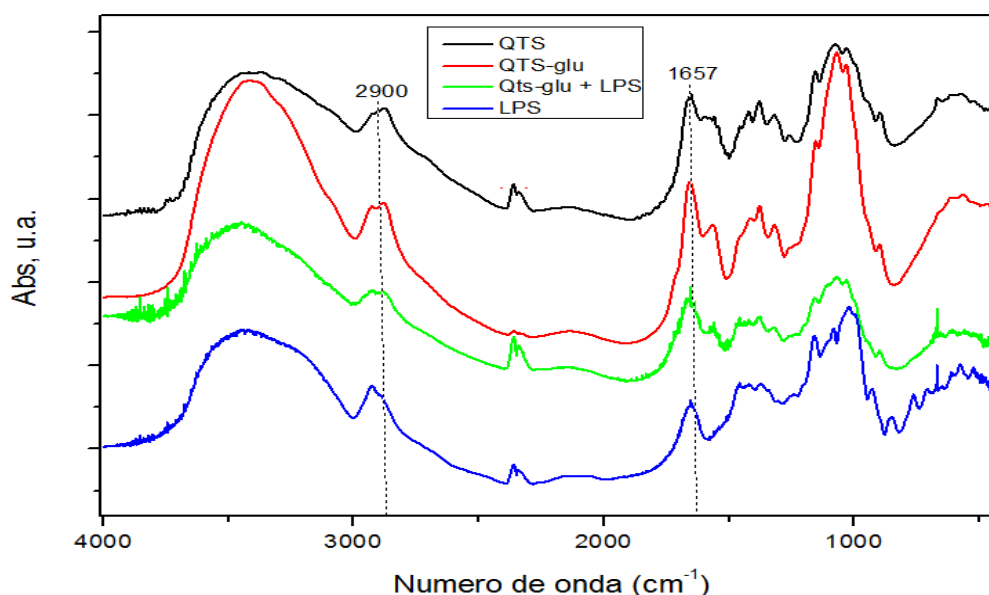


Figura 15. Espectros de infravermelho comparativos entre a quitosana pura, quitosana reticulada com glu 1,25%, quitosana reticulada com glu 1,25% + lipase LPS-SD e lipase LPS-SD pura.(KBr)

A partir da análise dos espectros acima, é possível observar que houve pouca mudança em relação ao espectro da quitosana reticulada com a reticulada contendo a lipase imobilizada. A banda destacada em 1657 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=N que pode ser resultante tanto da ligação da carbonila do glutaraldeído aos grupos amino livres na quitosana, quanto da mesma carbonila com o grupo amino terminal da lipase. No entanto, a presença desta mesma banda no espectro da lipase pura pode inferir que a interação entre ela e o suporte não tenha ocorrido por meio de uma ligação covalente, mas sim por um fenômeno de superfície, como uma adsorção física.

A possibilidade de ter ocorrido ambas as interações também não é desprezível, pois a banda por volta de 2900 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação N-H no suporte contendo a LPS-SD imobilizada, apresentou uma diminuição de intensidade quando comparada à mesma banda no suporte sem a lipase e à lipase pura, sugerindo que menos grupos -NH_2 encontravam-se disponíveis, validando o pressuposto de que houve a formação de ligação C=N.

Sendo assim, concluiu-se que a lipase interagiu com o suporte, ainda que não se tenha certeza de qual tipo de interação foi a predominante.

5.3.2. Determinação de grupamentos amina livres na quitosana

O ensaio de ninidrina foi realizado para as microesferas de quitosana reticuladas por 6h com glutaraldeído 1,25 e 5% (v/v), e para as microesferas reticuladas por 12h com glutaraldeído 1,25 e 5% (v/v). Aplicando a **Equação 2** no cálculo de determinação de grupamentos amina livres nas amostras de quitosana reticuladas obteve-se os seguintes resultados (**Tabela 1**).

Tabela 1: Teor de grupamentos amina livres na quitosana reticulada com glutaraldeído.

Tempo de reticulação (h)	Qts + glutaraldeído 1,25%	Qts + glutaraldeído 5%
6	39,4%	35,9%
12	35,0%	40,0%

A ninidrina é um poderoso agente oxidante que reage com aminoácidos e, normalmente, é utilizada na detecção de aminoácidos por apresentar uma amina primária. Quando um aminoácido é aquecido com ninidrina forma-se um composto intensamente colorido, conhecido como Púrpura de Rühmann. Todos aqueles que têm grupamentos amino livre produzem este composto, no qual a intensidade da cor é proporcional à concentração de espécies presentes (aminoácidos, peptídeos ou proteínas).⁴⁸

Na reação com quitosana, a solução de ninidrina assume uma forma colorida, a qual é atribuída à presença da camada de valência livre ou pelo número ímpar de elétrons, apresentando uma frequência baixa, o suficiente para absorver a luz do visível. Entretanto, isto deixa de acontecer quando estas aminas formam aminas secundárias ou terciárias, neste caso, na reação com um agente reticulante. Em consequência destas ligações, diferentes intensidades de coloração são medidas dependendo da quantidade de aminas livres que na solução.⁴⁸

A reação de ninidrina com a quitosana foi positiva, evidenciado pela formação de intensa coloração azul/violeta. Para a quitosana reticulada com solução aquosa de 1,25% de glutaraldeído verificou-se uma diminuição do teor

de grupos amina livres na quitosana quando o tempo de reticulação aumentou, o que é um resultado esperado, uma vez que quanto maior o tempo de reação entre a quitosana e o agente reticulante menor é a quantidade de grupos amino livres na cadeia polimérica. No entanto, essa tendência não foi observada para a quitosana reticulada com solução aquosa de 5% de glutaraldeído, pois verificou-se que em um tempo menor de reticulação a quantidade de grupos amino livres na cadeia polimérica também foi menor.

5.4. Determinação da porcentagem de imobilização (PI%) e da capacidade de imobilização da enzima (CI)

Para a determinação destes dois parâmetros, utilizou-se os suportes em que a reticulação e a imobilização das lipases ocorreram em etapas separadas. As microesferas reticuladas com glutaraldeído em diferentes tempos foram deixadas em contato com soluções aquosas das diferentes lipases de 0 à 72 h e, então, os sobrenadantes foram analisados espectrofotometricamente nos respectivos comprimentos de onda de cada uma das lipases.

Para este estudo, foi observada como a concentração de soluções aquosas contendo as lipases variava conforme o tempo de contato entre elas. Ao mesmo tempo, preocupou-se em verificar qual o tempo ótimo de contato das microesferas de quitosana reticuladas com as lipases.

De forma geral, constatou-se que a absorvância dos sobrenadantes das soluções decaiu ao longo do tempo, o que evidencia a ocorrência de interações químicas entre as lipases e os suportes. Este estudo, no entanto, não permite concluir se estas interações são caracterizadas como ligações covalentes ou interações de superfície (adsorção física) entre a lipase e o suporte.

Além disso, observou-se que a imobilização foi eficiente até certo ponto, ou seja, as interações entre as lipases e os suportes ocorreram até atingirem um limite. Para a F-AP15, verificou-se que acima de 70 h de contato a enzima começa a desprender-se do suporte e voltar para a solução. No caso da LPS-SD, a dessorção foi verificada para tempos maiores que 48h. Estas observações ficam mais claras ao serem analisadas graficamente, conforme visto na **Figura 16**.

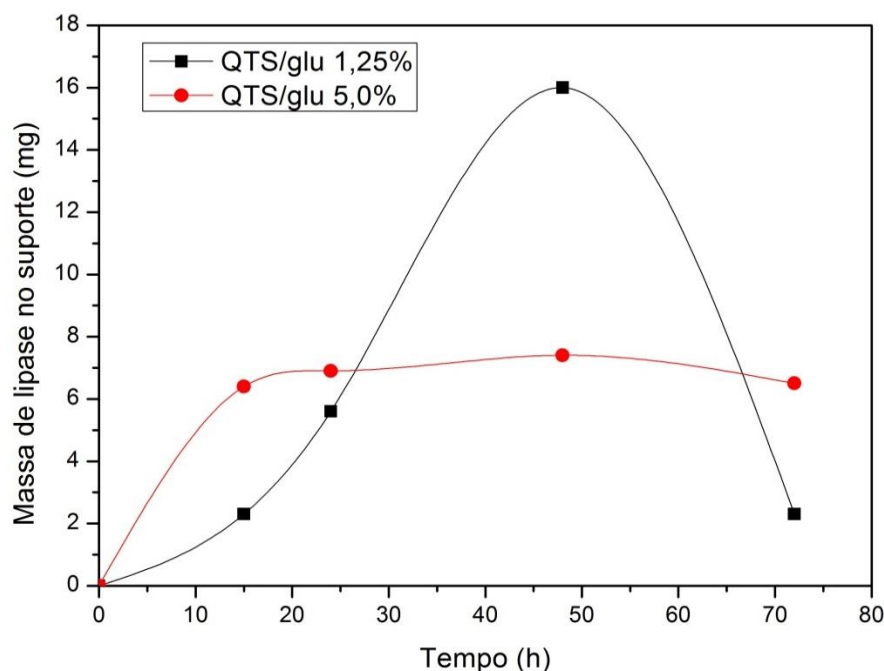


Figura 16. Imobilização de LPS-SD em suportes de quitosana/glutaraldeído 1,25 e 5,0%.

A Figura acima mostra a massa, em mg, da lipase LPS-SD que ficou imobilizada nos suportes de quitosana reticuladas com glutaraldeído 1,25 e 5,0%. Em ambos os suportes, observa-se o aumento da massa de lipase imobilizada conforme o tempo até o momento que a enzima começa a desorver do suporte. Porém, no suporte com menor proporção de glutaraldeído houve um aumento pronunciado da massa de enzima impregnada no suporte até 48 h de contato.

No tempo ótimo de imobilização, cerca de 16,0 mg de LPS encontrava-se imobilizada no suporte quitosana/glutaraldeído 1,25%, enquanto que, no suporte quitosana/glutaraldeído 5,0%, cerca de 7,4 mg da mesma encontrava-se imobilizada. Para a F-AP15, observou-se que no suporte quitosana/glutaraldeído 1,25% cerca de 17,0 mg da lipase encontrava-se ligada ou adsorvida no suporte no tempo ótimo de imobilização, enquanto que menos de 1 mg da mesma estava imobilizada no suporte de quitosana/glutaraldeído 5,0%. Dessa forma, conclui-se que, quanto maior a concentração de glutaraldeído no suporte, menor é a eficiência do mesmo na imobilização de lipases. Pode-se explicar este fato assumindo-se que, quanto maior a quantidade de grupos aldeídos disponíveis na superfície do suporte, maior é a

variedade de pontos aos quais a lipase pode ligar-se no mesmo, o que impede que a enzima ligue-se de forma efetiva, inativando-a.

A porcentagem de imobilização (PI%) e a capacidade de imobilização da enzima (CI) para as lipases analisadas, nos respectivos tempos ótimos, foram determinadas pelas **Equações 3 e 4**, respectivamente. Os resultados encontram-se organizados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Porcentagem de imobilização (PI%) e CI das lipases F-AP15 e LPS-SD nos suportes de quitosana/glutaraldeído.

F-AP15		
Suporte	PI (%)	CI (mg de lipase/mg de esferas)
QTS + glu 1,25%	48,7	0,057
QTS + glu 5,0%	15,3	$1,66 \times 10^{-3}$
LPS-SD		
Suporte	PI(%)	CI (mg de lipase/mg de esferas)
QTS + glu 1,25%	46,0	0,053
QTS + glu 5,0%	22,3	0,025

A imobilização da lipase F-AP15 no suporte de quitosana com menor proporção de glutaraldeído foi um pouco mais eficiente do que a imobilização da LPS-SD para o suporte com as mesmas características. Observou-se, entretanto, que ambos os suportes tiveram uma eficiência de imobilização inferior a 50%, mesmo em seus tempos ótimos de imobilização.

5.5. Aplicação das lipases imobilizadas nos suportes de quitosana/glutaraldeído

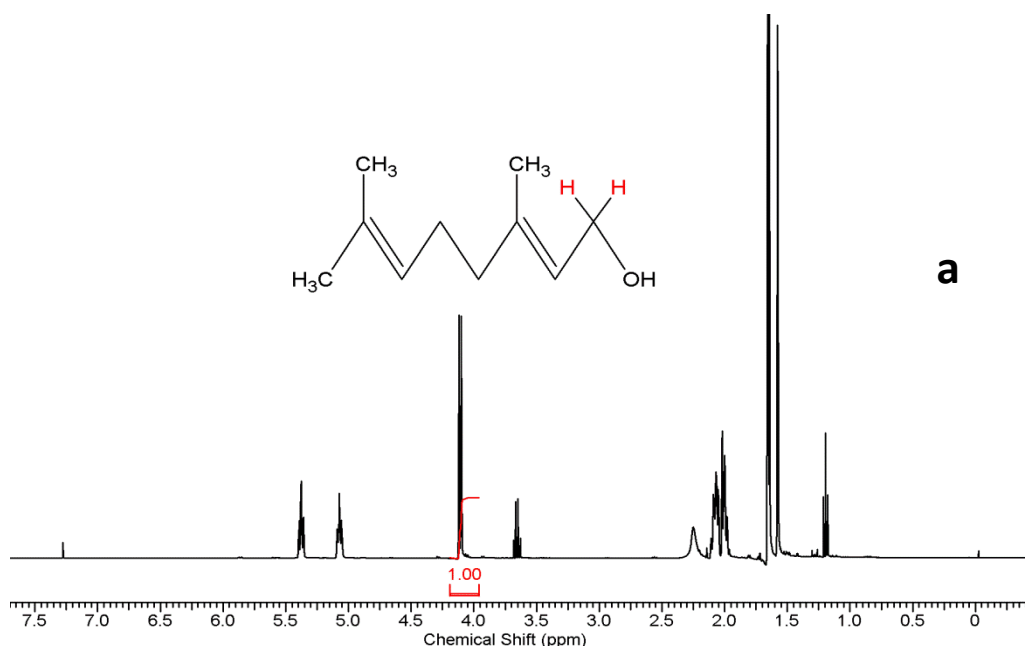
Os suportes contendo as lipases imobilizadas foram testados na síntese de ésteres derivados dos álcoois terpênicos geraniol e citronelol via reações de transesterificação. Os parâmetros estudados durante os ciclos reacionais foram: a eficiência dos suportes reticulados com diferentes concentrações de glutaraldeído; a eficiência catalítica de cada lipase imobilizada nos suportes; a influência do tempo de reação e o número de ciclos que um mesmo suporte

contendo lipase imobilizada pôde ser utilizado sem que a mesma perdesse sua atividade catalítica.

5.5.1. Eficiência catalítica das lipases F-AP15 e LPS-SD imobilizadas em suportes de quitosana/glutaraldeído

Os suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído 1,25% foram colocados em contato com soluções aquosas das lipases F-AP15 e LPS-SD durante seus respectivos tempos ótimos de imobilização. Em seguida, estes suportes foram usados na síntese do acetato de geranoíla, conforme o **Esquema 1** descrito no item 4.10. As reações foram acompanhadas de tempos em tempos por cromatografia em camada delgada (ccd). Nos espectros de RMN de ^1H , a presença de produto foi observada por comparação da área dos hidrogênios metilênicos vizinhos da função álcool com os do éster. No geraniol, o pico referente ao hidrogênio metilênico vizinho do $-\text{OH}$ encontra-se próximo a 3,9 ppm. No acetato de geranoíla, o mesmo hidrogênio aparece entre 4,4 a 4,6 ppm. A conversão ao éster foi determinada assumindo que a soma das áreas de ambos os picos é 100% e, cada um dos dois picos, representa uma porcentagem do todo.

Os espectros de RMN- ^1H do geraniol e do acetato de geranoíla podem ser vistos nas **Figuras 17a e 17b**, cujos hidrogênios considerados para a determinação da porcentagem de conversão encontram-se destacados.



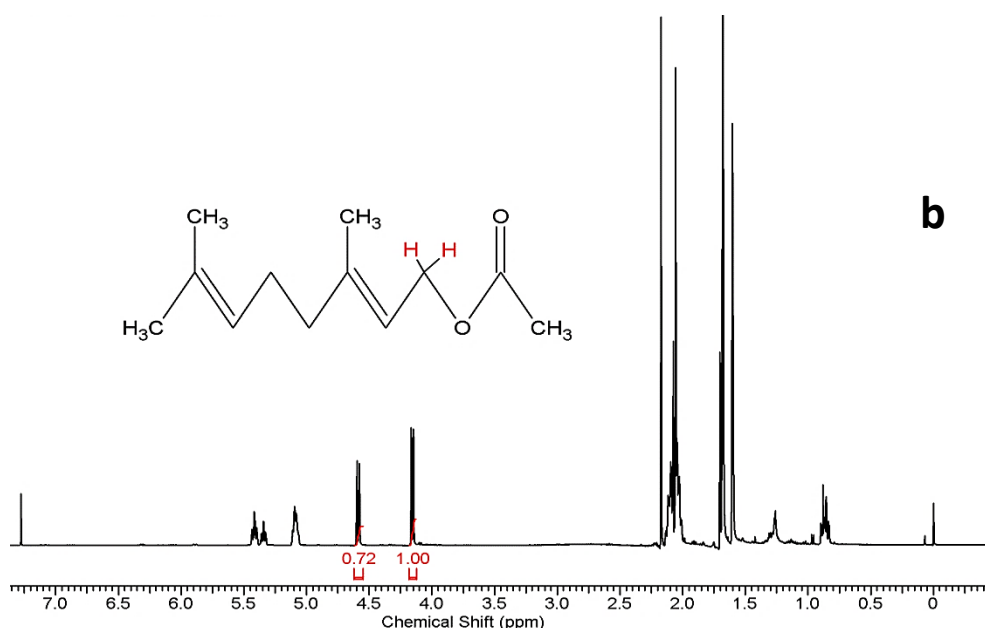


Figura 17. Espectros de RMN- ^1H do (a) geraniol e (b) acetato de geranoíla (CDCl_3 , 400 MHz).

Inicialmente, foram testados os suportes contendo a lipase F-AP15 na reação do geraniol com acetato de vinila. Após 24 h não foi observado a formação de produto por ccd, pois não houve mudança de R_f das manchas referentes ao álcool ($R_f = 0,62$) e mistura reacional ($R_f = 0,62$). Além disso, no espectro de RMN de ^1H do geraniol, não foi observado os picos referentes ao éster em 4,6 ppm, comprovando que o produto não foi formado.

Sob as mesmas condições reacionais, testou-se a eficiência da lipase LPS-SD no preparo do acetato de geranoíla. Em 24 h de reação, observou-se a formação de produto por ccd ($R_{f\text{álcool}} = 0,65$ / $R_{f\text{mistura reacional}} = 0,70$) e também pelo deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos vizinho ao grupo éster, em 4,60 ppm. O acetato de geranoíla foi obtido com conversão de 13%. Este procedimento foi repetido com ambas as lipases, e os resultados foram análogos.

A seguir, os suportes preparados com microesferas úmidas também foram utilizados neste estudo e os resultados mostraram que os suportes contendo a LPS-SD foram mais eficazes que os com a F-AP15 na formação acetato de geranoíla, com conversões de 30 e 10%, respectivamente.

A partir destes testes preliminares, pode-se concluir que a lipase LPS-SD foi mais eficiente na reação estudada. Devido a este fato, os demais

estudos foram conduzidos utilizando-se suportes de quitosana/glutaraldeído contendo a lipase LPS-SD imobilizada.

5.5.2. Estudo da reticulação do suporte quitosana/glutaraldeído

As microesferas secas reticuladas com glutaraldeído 1,25% mostraram-se eficientes na imobilização da LPS-SD e preparação do éster acetato de geranoíla. A seguir, para avaliar a influência da concentração do agente reticulante, testaram-se suportes com diferentes concentrações de glutaraldeído contendo a LPS-SD imobilizada na síntese do acetato de geranoíla. As reações com os diferentes suportes foram conduzidas sob as mesmas condições reacionais.

Neste estudo, foi observado que houve a conversão do geraniol em acetato de geranoíla tanto para os sistemas contendo os suportes quitosana/glutaraldeído 1,25% quanto para os contendo os suportes de quitosana/glutaraldeído 5,0%. Para o primeiro, a conversão foi de 42%, enquanto que para o segundo, foi de 35%. Sendo assim, pode-se concluir que os sistemas contendo os suportes reticulados com glutaraldeído 1,25% mostraram-se mais eficientes para a reação estudada. Esses resultados estão de acordo com as observações obtidas no estudo de determinação da eficiência de imobilização da lipase LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana/glutaraldeído. Conforme discutido no item 5.4, os suportes de quitosana/glutaraldeído 1,25% foram mais eficientes na imobilização da lipase LPS-SD, o que explica as maiores conversões obtidas para os sistemas contendo estes suportes.

Estendendo esta análise para os suportes preparados com microesferas úmidas, observou-se que ao usar o suporte reticulado com glutaraldeído 5,0% a conversão em acetato de geranoíla foi de 31%, enquanto que o reticulado com glutaraldeído 1,25% foi de 29,6%. Apesar de baixa, esta diferença pode estar associada ao alto grau de porosidade das microesferas úmidas reticuladas com maior concentração do agente reticulante, o que favorece a maior dispersão da lipase no suporte e, portanto, garantindo maior contato com os reagentes.

5.5.3. Influência do tempo na obtenção do éster acetato de geranoíla

Avaliou-se a influência do tempo de reação de formação do acetato de geranoíla. Para este estudo, utilizou-se as microesferas secas de quitosana reticuladas com glutaraldeído 1,25 e 5,0% contendo a lipase LPS-SD imobilizada. As reações foram realizadas sob as mesmas condições de temperatura e os tempos de reação foram de 24, 48 e 72h. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 18**.

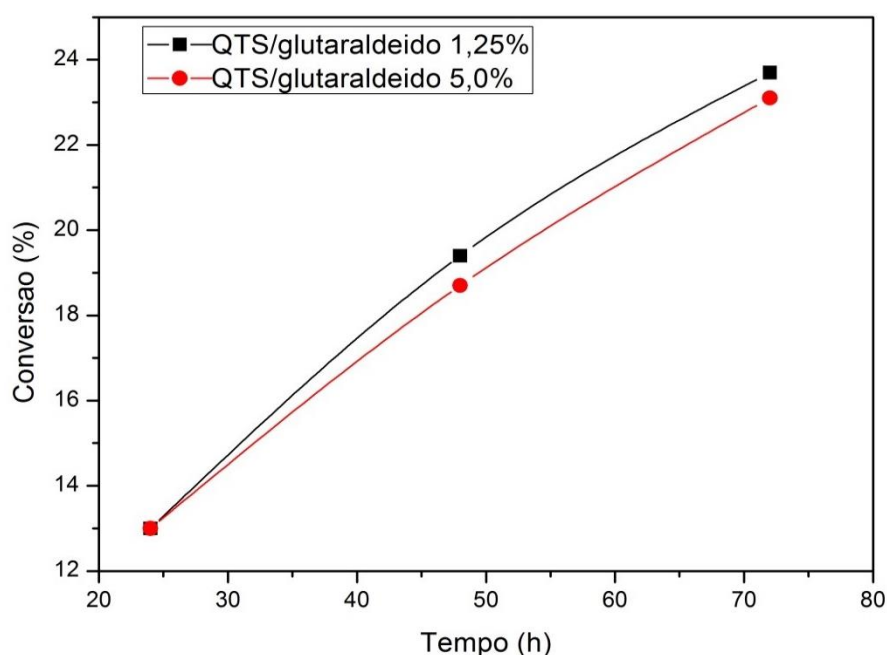


Figura 18. Influência do tempo de reação na síntese do acetato de geranoíla. [Reagentes: 0,1 mol de geraniol, 0,1 mol de acetato de vinila; solvente: *n*-hexano; temperatura: 35°C]

A partir da análise da **Figura 18** pode-se concluir que a conversão do geraniol em acetato de geranoíla foi dependente do tempo de reação. Conforme aumentou o tempo de reação obteve-se maior porcentagem de conversão. Ao usar estes suportes, a maior conversão foi obtida após 72h de reação, sendo de 23,7%, e a menor de 13%, após 24h. Ao usar os suportes reticulados com glutaraldeído 5,0%, a maior conversão também foi obtida após 72h de reação, sendo de 23,1%, e a menor de 13%, após 24h de reação.

5.5.4. Estudo do reúso dos suportes quitosana/glutaraldeído

A estabilidade da lipase LPS-SD imobilizada foi avaliada por meio do reuso do mesmo suporte em 5 ciclos reacionais, sob as mesmas condições de temperatura e tempo. Para este estudo, partiu-se do suporte que havia obtido maior taxa de conversão (42%) na síntese do acetato de geranoíla, a 35°C e em 48h. As conversões obtidas após cada reuso podem ser visualizados na **Figura 19**.

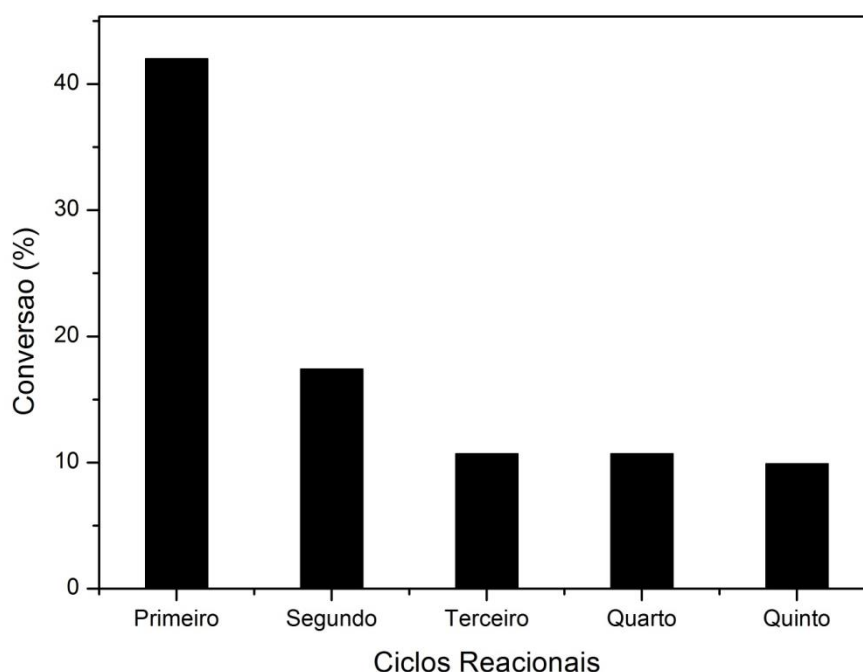


Figura 19. Reuso da lipase LPS-SD imobilizada no suporte quitosana/glutaraldeído 1,25%.
[Reagentes: 0,1 mol de geraniol, 0,1 mol de acetato de vinila; solvente: *n*-hexano; temperatura: 35°C; tempo: 48h.]

Observa-se que, do primeiro para o segundo ciclo, a conversão da reação reduziu de 42 para 17,4%. Nos ciclos subsequentes, essa diminuição ocorreu menos pronunciadamente, sendo que, do terceiro para o quarto ciclo, a conversão foi de 10,7% e, do quarto para o quinto, 9,9%.

Através dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que a imobilização da lipase no suporte garantiu à ela maior estabilidade e tempo de uso sem que houvesse comprometimento significativo de sua atividade catalítica.

5.5.5. Caracterização do acetato de geranoíla por FTIR

O acetato de geranoíla sintetizado foi caracterizado por RMN-¹H após cada síntese e teste feito, conforme discutido nos itens anteriores. No entanto, o produto da reação obtido com maior conversão (42%) também foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho. O espectro obtido encontra-se na **Figura 20**.

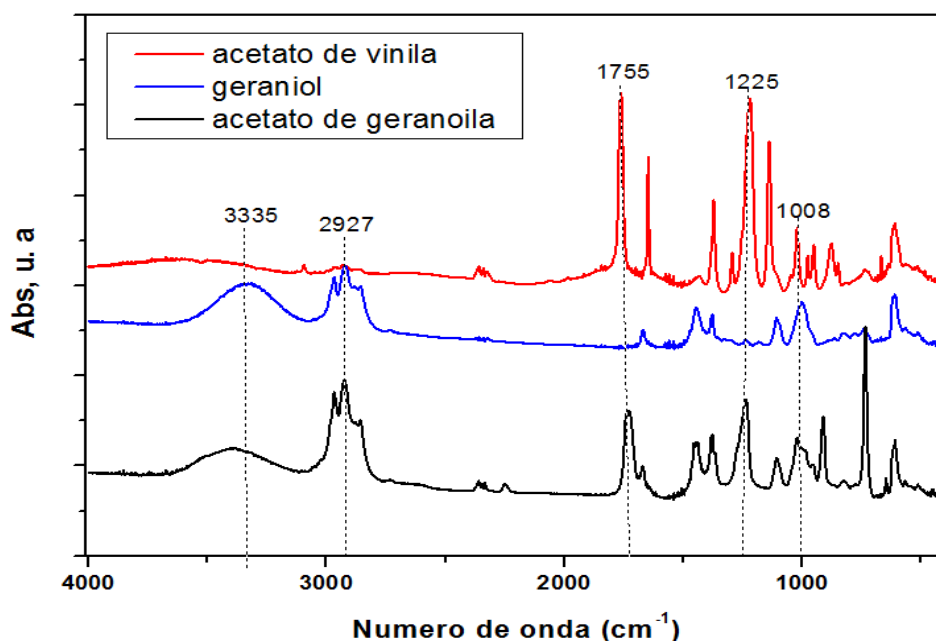


Figura 20. Espectro de FTIR para o acetato de geranoíla. (Placas de Si)

A partir da análise do espectro de IV é possível visualizar uma banda por volta de 3330-3340 cm^{-1} referente ao estiramento de -OH do álcool precursor (geraniol), indicando que a conversão não foi, de fato, 100%. No entanto, é perceptível uma banda por volta de 1700-1755 cm^{-1} referente ao estiramento de carbonila de éster, assim como uma por volta de 1200-1250 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O de éster. A presença dessas bandas, ainda que de baixa intensidade, devido às baixas conversões, evidenciam a formação do éster acetato de geranoíla. Além disso, observa-se uma banda por volta de 1000-1050 cm^{-1} , característico de estiramento de C-O de álcool, e entre 2920-2930 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação C-H de carbono sp^3 .⁴⁷

Além das baixas conversões, a presença de bandas características de álcoois ainda nos espectros dos produtos também pode ser explicada pelo fato de que os mesmos não foram totalmente purificados após as reações.

CAPÍTULO II: Preparação, caracterização e imobilização de lipases para uso em síntese orgânica de suportes de quitosana reticulada com TPP

Neste capítulo, serão discutidos os resultados obtidos referentes ao suporte de quitosana reticulada com TPP. Estes suportes foram caracterizados e, então, utilizados na imobilização da lipase LPS-SD para aplicações na síntese dos acetatos de geranoíla e de citroneíla. Alguns parâmetros foram avaliados durante a síntese dos ésteres, como tempo e temperatura de reação.

5.6. Preparação e morfologia dos suportes de quitosana/TPP

A preparação dos suportes de quitosana reticulada com TPP foi realizada conforme procedimento descrito em 4.5.2. Na preparação destes suportes, a imobilização da LPS-SD ocorreu concomitantemente à formação das microesferas, uma vez que a lipase foi solubilizada na solução de quitosana e, em seguida, gotejada na solução de TPP. Para a realização desta análise, as microesferas obtidas foram acondicionadas a -4°C e liofilizadas.

As microesferas obtidas apresentaram formato esférico com diâmetro médio de $2100 \pm 115 \mu\text{m}$ para as microesferas de quitosana reticulada com TPP puras e $1941 \pm 105 \mu\text{m}$ para as microesferas contendo a lipase, cujas micrografias podem ser vistas na **Figura 21**.

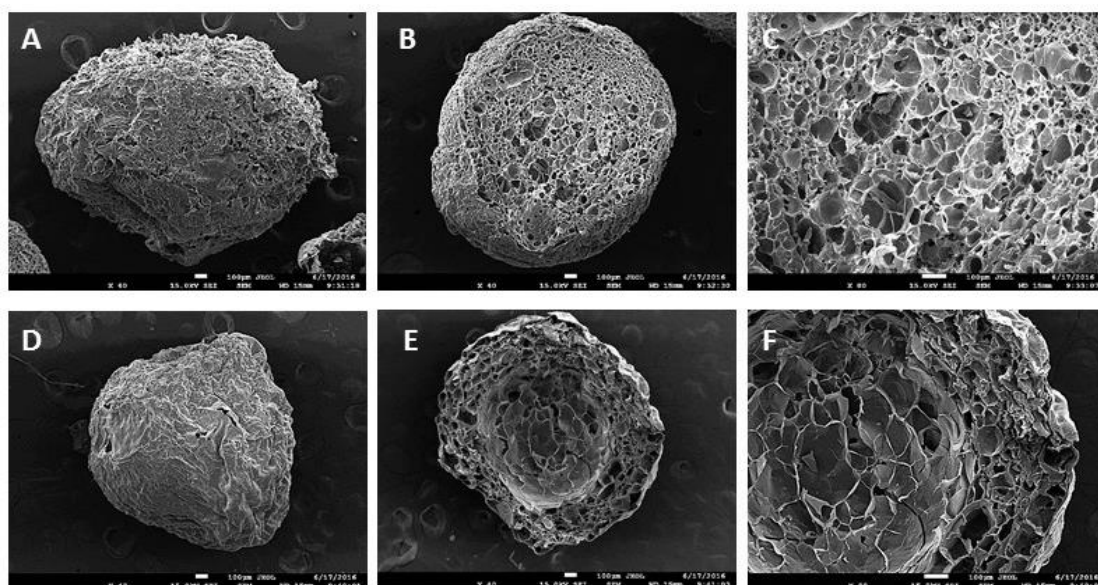


Figura 21. Microesferas de quitosana reticulada com TPP sem lipase (A, B e C) e contendo a lipase LPS-SD imobilizada (D, E e F).

As imagens acima mostram que as microesferas de quitosana reticulada com TPP são bastante porosas. As microesferas contendo a LPS-SD foram menores e apresentaram características estruturais internas diferentes das que não continham a lipase, assemelhando-se à microcápsulas, apresentando o centro oco circundado por uma rede polimérica mais intrincada. Essa mudança na estrutura física da microesferas sugere que a lipase interagiu com a rede polimérica da quitosana reticulada ionicamente com TPP. Devido à estas mudanças estruturais, torna-se mais apropriado o uso do termo “microcápsulas” para os suportes de quitosana reticulada com TPP contendo a lipase imobilizada.

Concomitantemente, foi feita uma análise de EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector) para as microesferas reticuladas com TPP sem e com a lipase LPS-SD imobilizada. Os espectros obtidos encontram-se nas **Figuras 22a e 22b**.

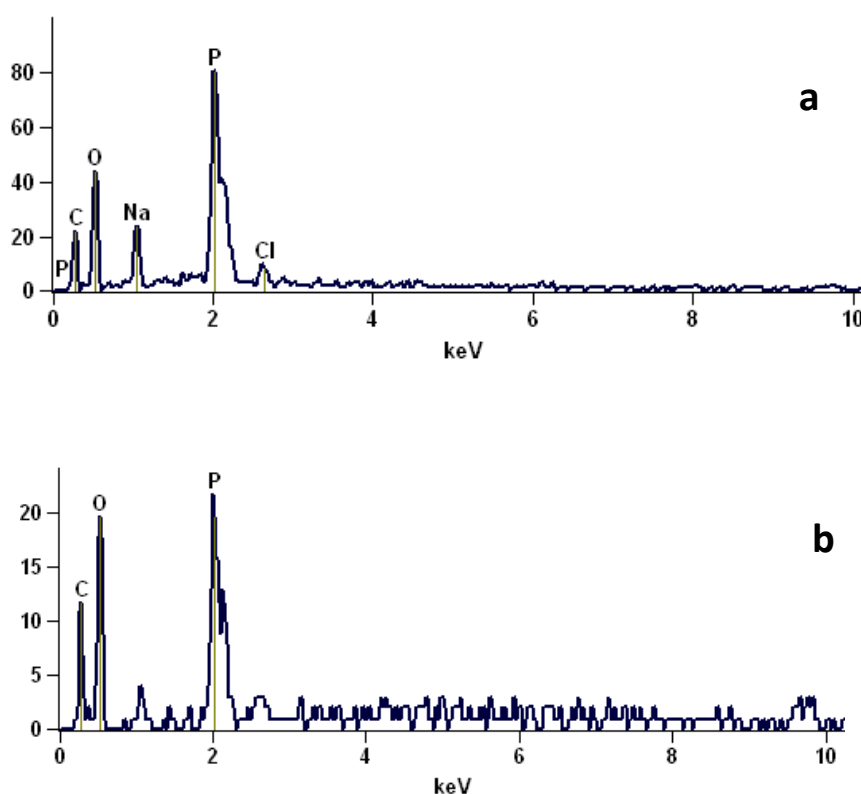


Figura 22. Espectros de EDS para as microesferas de quitosana reticuladas com TPP **(a)** sem a lipase e **(b)** contendo a lipase LPS-SD imobilizada.

O espectro de EDS mostra que há um grande teor de átomos de fósforo e de oxigênio em ambas as amostras (sem e com a lipase imobilizada), o que comprova a ocorrência da reticulação, uma vez que a presença desses átomos na rede polimérica da quitosana evidencia a interação iônica entre os grupos amino protonados com os íons fosfato provenientes do TPP. É possível observar também um expressivo aumento do teor de carbonos quando compara-se ambos os espectros, o qual está associado à própria quitosana e à lipase imobilizada.

5.7. Espectroscopia de infravermelho das microcápsulas de quitosana/TPP

Na **Figura 23** são apresentados os espectros de infravermelho das microcápsulas de quitosana pura e dos suportes de quitosana/TPP.

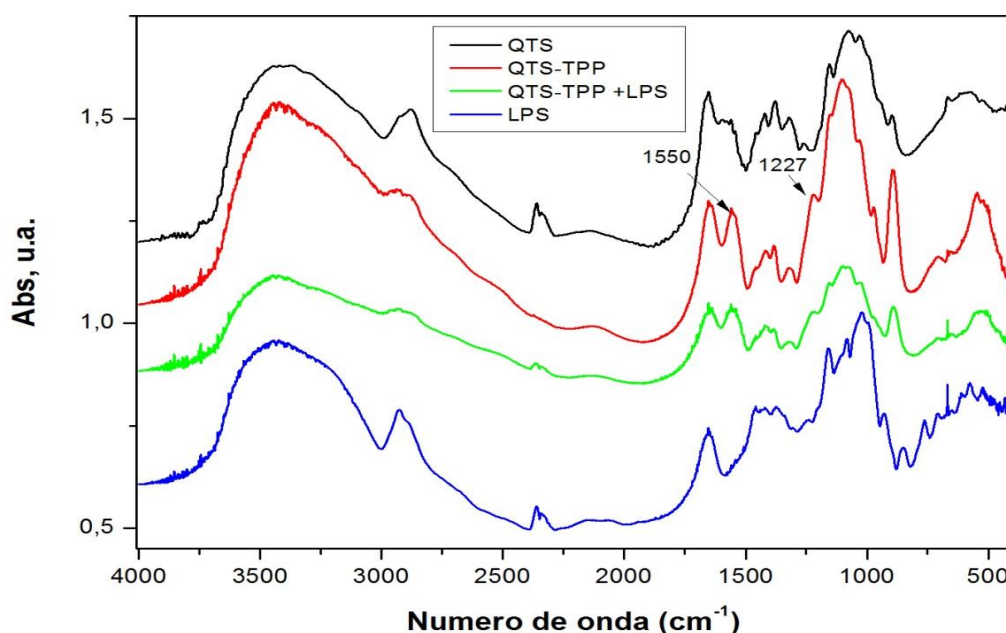


Figura 23. Espectros de FTIR da quitosana pura, quitosana reticulada com TPP, quitosana com TPP contendo a lipase LPS-SD imobilizada e da lipase pura. [em pastilhas de KBr]

Observa-se nos espectros das micropartículas contendo o TPF que a interação do tripolifosfato ocorre com os grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) da quitosana, portanto, uma interação iônica pode ser evidenciada na região próxima a 1550 cm^{-1} . Estas observações também foram relatadas nos estudos de Xu e Du, (2003)⁴⁹, na preparação de nanopartículas para a liberação de

soro albumina bovina. Laus *et al.*, (2006)⁵⁰, também obtiveram as mesmas evidências nos seus estudos na preparação de microesferas reticuladas com TPP, para o tratamento de águas contaminadas pela mineração de carvão. A banda em 1227 cm^{-1} está relacionada às vibrações de estiramento do grupo P=O do fosfato.

Desta forma, a partir das evidências apontadas pela análise de infravermelho, pode-se concluir que o TPP encontra-se ligado à quitosana a partir de interações iônicas entre os grupos fosfato e amino sugerindo, assim, que as microesferas obtidas possuem estrutura reticulada.

5.8. Aplicação das lipases imobilizadas nos suportes de quitosana/TPP

Os suportes contendo a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana/TPP foram testados na síntese de ésteres derivados do geraniol e citrônolol *via* reações de transesterificação. Avaliaram-se alguns parâmetros relacionados à síntese, tais como a influência do tempo e da temperatura de reação.

5.8.1. Influência do tempo de reação

As reações de transesterificação dos geraniol e citrônolol com acetato de vinila foram realizadas em períodos de tempo que variaram de 24 a 96h. A **Figura 24** mostra os resultados obtidos.

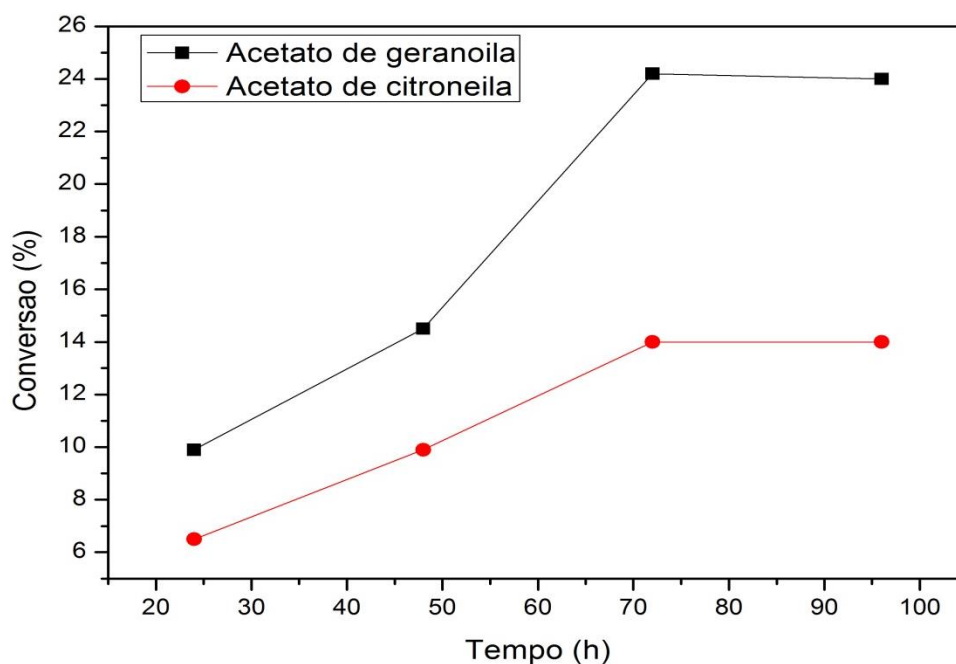


Figura 24. Influência do tempo de reação nos suportes de quitosana/TPP. [Massa de LPS-SD: 40mg; Reagentes: 0,1 mol de geraniol, 0,1 mol de citronelol, 0,1 mol de acetato de vinila; solvente: *n*-hexano; temperatura: 35°C]

Conforme pode ser observado, as reações foram dependentes do tempo. De modo geral, as conversões foram maiores para tempos maiores de reação. Na síntese do acetato de geranoila, as conversões foram de 9,9, 14,5 e 24,2% em 24, 48 e 72h, respectivamente. Foi verificado que quando a reação foi realizada em 96h não houve um aumento significativo na conversão, sendo de 24%.

Na síntese do acetato de citroneila, as conversões foram de 6,5, 9,9 e 14,0% em 24, 48 e 72h, respectivamente. Analogamente, foi verificado que quando a reação foi realizada em 96h não houve um aumento significativo na conversão, sendo de, aproximadamente, 14%.

5.8.2. Influência da temperatura

A influência da temperatura na síntese dos ésteres terpênicos foi avaliada em duas temperaturas, 35 e 40°C. As **Figuras 25a e 25b** mostram os resultados obtidos.

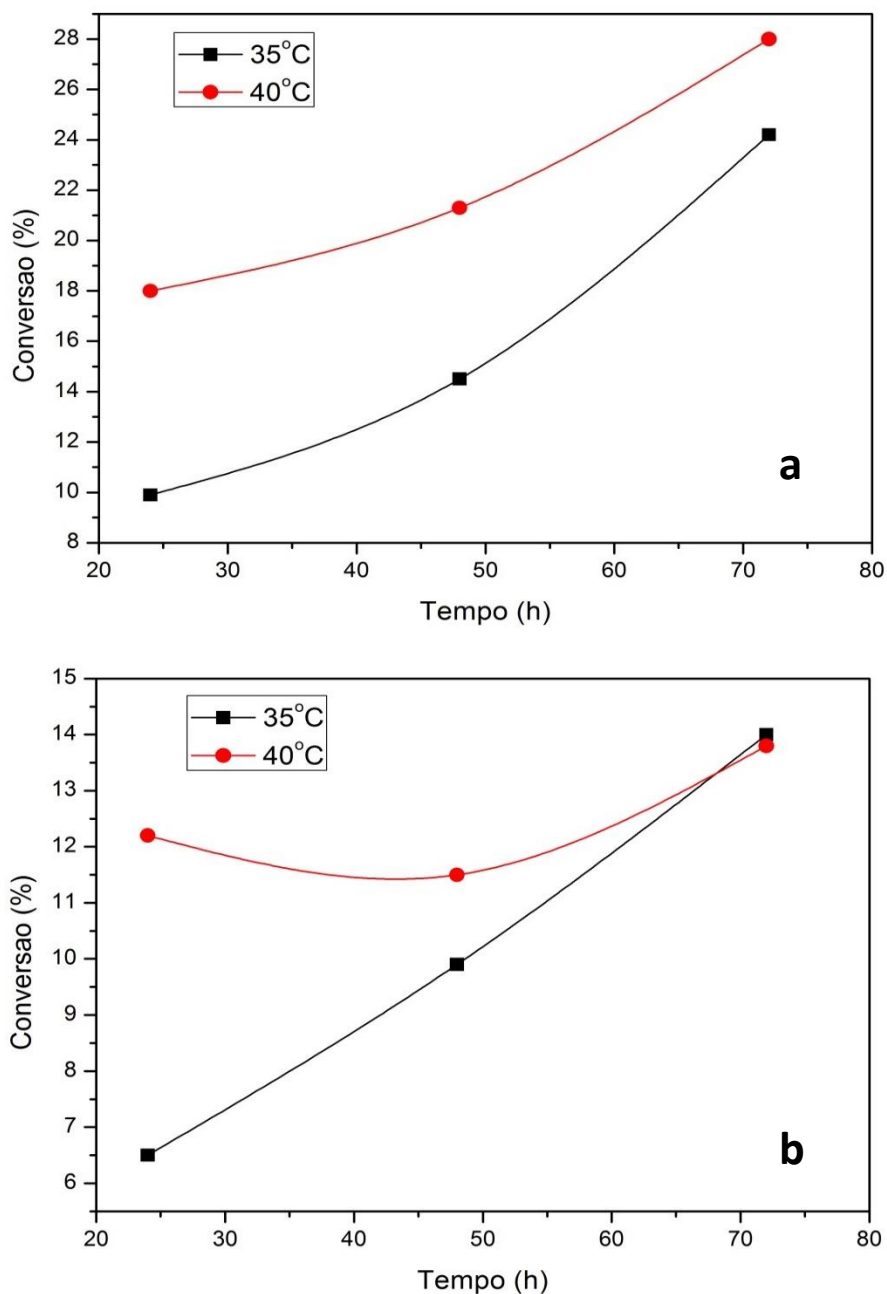


Figura 25. Influência da temperatura na síntese do (a) acetato de geranoíla e (b) acetato de citroneíla nos suportes de quitosana/TPP. [Massa de LPS-SD: 40mg; Reagentes: 0,1 mol de geraniol, 0,1 mol de citrionelol, 0,1 mol de acetato de vinila; solvente: *n*-hexano]

Pode-se observar que a formação de ambos os ésteres foram dependentes da temperatura. Na síntese do acetato de geranoíla, as conversões foram de 9,9, 14,5 e 24,2% em 24, 48 e 72h, respectivamente, para as reações realizadas a 35°C. Aumentando-se a temperatura para 40°C, as conversões foram de 18,0, 21,3 e 28,0% em 24, 48 e 72h de reação, respectivamente.

Na síntese do acetato de citroneíla, as conversões foram de 6,5, 9,9 e 14,0% em 24, 48 e 72h, respectivamente, para as reações realizadas a 35°C. Quando realizadas em 40°C, observou-se que as conversões foram de 12,3, 11,5 e 13,8% em 24, 48 e 72h de reação, respectivamente.

A partir desses resultados, foi observado que, para as reações de formação do acetato de geranoíla, o aumento de temperatura foi favorável para os sistemas testados, obtendo-se conversões relativamente maiores. A mesma tendência não foi verificada para as reações de formação do acetato de citroneíla. Além disso, o aumento de temperatura não comprometeu a atividade catalítica da lipase LPS-SD, cuja atividade máxima na forma livre, segundo ficha técnica, é de 50°C.⁵¹

5.8.3. Caracterização do acetato de citroneíla por RMN-¹H e FTIR

Os acetatos de geranoíla e de citroneíla sintetizados foram caracterizados por RMN-¹H após cada síntese e teste feito, conforme discutido nos itens anteriores. A conversão de cada um dos ésteres foi determinada comparando-se o deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos vizinhos ao -OH (nos álcoois) e à função éster (nos ésteres terpênicos). Para o acetato de geranoíla, os deslocamentos e espectros de RMN-¹H foram descritos no item 5.5.1. Da mesma forma, o espectro de infravermelho para este éster foi mostrado e discutido no item 5.5.5.

Para o citrionelol, os picos referentes aos hidrogênios descritos aparecem em 3,9 ppm, enquanto que no acetato de citroneíla, os mesmos aparecem em 4,1 ppm. O espectro de RMN-¹H para o acetato de citroneíla, obtido com conversão de 14%, encontra-se no **Anexo III**. Esta mesma amostra foi analisada por FTIR, cujo espectro encontra-se na **Figura 26**.

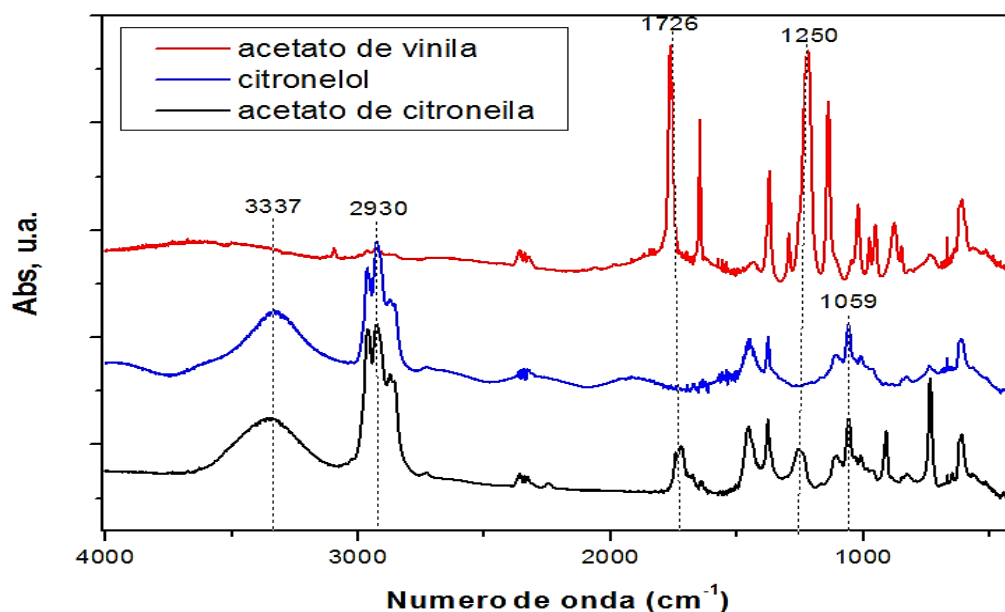


Figura 26. Espectro de FTIR para o acetato de citroneíla. (Placas de Si)

De modo semelhante às discussões feitas para o espectro de IV do acetato de geranoíla, pode-se observar a presença de bandas características de ésteres, como em 1726 cm^{-1} (referente à carbonila) e em 1250 cm^{-1} (referente ao estiramento de C-O de éster). Ainda pode-se observar a banda por volta de 3337 e 1059 cm^{-1} , referentes o estiramento de -OH e de C-O de álcool, respectivamente. A banda por volta de 2930 é característica de estiramento de carbono sp^3 .

6. CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados e dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- ✓ A quitosana utilizada na preparação dos suportes apresentava grau de desacetilação igual a 81%, segundo caracterização feita por espectroscopia no infravermelho.
- ✓ Foram preparadas microesferas de quitosana secas e úmidas, as quais apresentaram diâmetro médio de 650 a 850 μ m. As esferas secas permaneceram rígidas, enquanto as úmidas tornaram-se frágeis após a reticulação.
- ✓ A reticulação das microesferas de quitosana, tanto secas quanto úmidas, foi verificada por espectroscopia de infravermelho por meio da comparação dos espectros da quitosana pura com os da quitosana reticulada por 6 ou 12 h com glutaraldeído 1,25 ou 5,0% (v/v).
- ✓ O teste de ninidrina realizado com as microesferas secas reticuladas foi positivo e mostrou que houve uma diminuição do teor de grupamentos amina livres nas microesferas reticuladas por 12h com glutaraldeído 1,25% (v/v) em relação às reticuladas por 6h. Essa tendência não foi observada para as microesferas reticuladas com glutaraldeído 5,0% (v/v).
- ✓ Os suportes mostraram-se eficientes na imobilização das lipases, onde foi observado que a lipase F-AP15 apresentou uma maior eficiência de imobilização num tempo ótimo de 48h. A lipase LPS-SD apresentou eficiência ligeiramente inferior e um tempo ótimo de imobilização de 70h.
- ✓ Os suportes com as lipases imobilizadas foram empregados na síntese de ésteres derivados dos álcoois terpênicos geraniol e citronelol via reações de transesterificação, onde se verificou que a lipase LPS-SD foi mais eficiente na formação dos produtos.
- ✓ Suportes contendo a lipase LPS-SD foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, onde não foi observada diferença significativa nos espectros da quitosana reticulada e da quitosana reticulada contendo a lipase, sugerindo que a mesma deve ter interagido com o suporte por meio de uma adsorção física na superfície deste.

- ✓ Ao usar a lipase LPS-SD imobilizada em microesferas reticuladas com glutaraldeído 1,25% (v/v) obteve-se maior conversão do que ao usar as reticuladas com glutaraldeído 5,0%, evidenciando uma maior interação da lipase suportes reticulados com menor concentração do agente reticulante.
- ✓ As reações foram dependentes do tempo de reação, onde foi observado que, em tempos maiores de reação, as conversões dos reagentes aos seus respectivos produtos também aumentou, passando de 13% em 24h de reação para, aproximadamente, 24% em 72h (nas reações realizadas com o suporte de quitosana/glutaraldeído 1,25%).
- ✓ A estabilidade da LPS-SD foi avaliada por meio do número de reusos possíveis sem perda da atividade catalítica. Foi verificado que cerca de 25% da atividade catalítica da lipase foi mantida após 5 ciclos reacionais, sob as mesmas condições de temperatura e tempo de reação.
- ✓ As microesferas de quitosana reticulada com TPP são altamente porosas e apresentaram estrutura interna modificada após a adição da LPS-SD, comprovando a interação lipase-suporte.
- ✓ Os suportes de quitosana/TPP contendo a LPS-SD imobilizada mostraram-se eficientes na síntese dos ésteres terpênicos, sendo que as conversões foram dependentes do tempo e temperatura de reação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO, G. F., AGRAWAL, P., ARAÚJO, E. M., MELO, T. J. A. **Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
2. UJANG, Z., SALIM, R.S., SALIM, M.R. **Microbial biopolymerization production from palm oil mill effluent (POME)**. Biopolymers Magdy Elnashar (Ed.) ISBN 978-953-30-7109-1. Published by Sciyo, 2010.
3. HAMED, I., ÖZOGUL, F., REGENSTEIN, J. **Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review**. Trends in Food Science & Technology, v. 48, p. 40-50, 2016.
4. TAN, C.S., KHOR, E., TAN, T.K., WONG, S.M., **The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination**. Talanta, v. 45, p. 713 – 719, 1998.
5. KITTUR, F. S., THARANATHAN, R. N., **Chitin – the undisputed biomolecule of great potential**, Critical Review in Food Science and Nutrition, v. 43, p. 61-87, 2003.
6. ACOSTA, N. *et al.* **Extraction and characterization of chitin from crustaceans**. Biomass and Bioenergy, v. 5, n. 2, p. 145-153, 1993.
7. ZVEZDOVA, D. **Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea**. Annual Proceedings, " Angel Kanchev" University of Ruse, v. 49, n. 9.1, p. 65-69, 2010.
8. PAULINO, A. T. *et al.* **Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides**. Carbohydrate Polymers, v. 64, p. 98–103, 2006.
9. NETO, C. G. T. *et al.* **Thermal analysis of chitosan based networks**. Carbohydrates Polymers, v. 62, p. 97-103, 2005.
10. GONSALVES, A. A. *et al.* **Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana**. Química Nova, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.
11. BARROS, F. C. F *et al.* **Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente**. Revista Iberoamericana de Polímeros, v. 7, p. 232–246, 2006.
12. CLEASEN, C., WHILHELMS, T., KULICKE, W. M. **Formation and characterization of chitosan membranes**. Biomacromolecules, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

13. DASHA, M. et al. **Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications**. Progress in Polymer Science, v. 36, p. 981–1014, 2011.
14. LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. de. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
15. RINAUDO, M. **Chitin and chitosan: properties and applications**. Progress in Polymer Science, v. 31, p. 603-632, 2006.
16. KURITA, K., YOSHIDA, Y., UMEMURA, T. **Finely selective protections and deprotections of multifunctional chitin and chitosan to synthesize key intermediates for regioselective chemical modifications**. Carbohydrate Polymers, v. 81, n. 2, p. 434-440, 2010.
17. MONTEIRO, O.A.C, AIROLDI, C. **Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 26, n. 2, p. 119-128, 1999.
18. MENDES, A. A. *et al.* **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. Química Nova, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
19. COELHO, T.C. *et al.* **Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross-linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions**. Reactive and Functional Polymers, v. 67, n. 5, p. 468-475, 2007.
20. XIAO, Y.; ZHOU, X. **Synthesis and properties of a novel crosslinked chitosan resin modified by L-lysine**. Reactive and functional polymers, v. 68, n. 8, p. 1281-1289, 2008.
21. BRUCE, P. Y. **Organic Chemistry**. 5th Edition. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2006.
22. MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 1ª Ed. Pioneira Thomson Learning: São Paulo. 2006.
23. LINS, L.C.V. **Micropartículas compostas de PHB/cetoprofeno recobertas com quitosana reticulada**. Tese de doutorado, 2012.
24. ORREGO, C. E. et al. **Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: characterization aspects**. Carbohydrate Polymers, v. 79, n.1, p. 9-16, 2010.
25. PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. **Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation**. Progress in Polymer Science, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

26. DESAI, K. G. H.; PARK, H.J. **Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying.** Journal of Microencapsulation, v. 22, n. 2, p. 179-192, 2005.
27. LAUS, R. *et al.* **Adsorption and desorption of Cu (II), Cd (II) and Pb (II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent.** Journal of Hazardous Materials, v. 183, n. 1, p. 233-241, 2010.
28. FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook.** Springer Science & Business Media, 1997.
29. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry.** 4 Ed. Madison: Worth Publishers, 2004.
30. KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** Process Biochemistry, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
31. KHAN, N.R.; RATHOD, V.K. **Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review.** Process Biochemistry, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, 2015.
32. LIESE, A.; HILTERHAUS, L. **Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications.** Chemical Society Reviews, v. 42, n. 15, p. 6236-6249, 2013.
33. RAJENDRAN, A., PALANISAMY, A., THANGAVELU, V. **Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries.** Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 207-219, 2009.
34. MATEO, C. *et al.* **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
35. CARDOSO, C.L., MORAES, M.C., CASS, Q.B. **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 1, p.175-187, 2009 .
36. VAGHARI, H. *et al.* **Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization.** Biotechnology Letters, v. 38, n. 2, p. 223-233, 2016.
37. CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. **Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects.** Biotechnology advances, 2015.
38. MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. **A reação de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel.** Revista Virtual de Química, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2013.

39. JOLL, C. A., ALESSANDRINO, M. J., HEITZ, A. **Disinfection by-products from halogenation of aqueous solutions of terpenoids**. Water Research, v. 44, p. 232-242, 2010.
40. DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, p.109-128, 1996.
41. MARANA, N., DUCATI, L., DA SILVA FILHO, L. **Determinação da estrutura de diferentes álcoois terpênicos: um estudo teórico e experimental**. Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, North America, p. 7-16, 2013.
42. BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. Wiley: New York, 2008.
43. SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNAN, E. **Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances**. Trends in Biotechnology, v. 23, n. 4, p. 193-198, 2005.
44. <https://www.amano-enzyme.co.jp/>, acesso em 13 de abril de 2016.
45. BRUGNEROTTO, J. et al. **An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization**. Polymer, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.
46. CAVELLO, I. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CAVALITTO, S. F. **Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads**. Process Biochemistry, v. 49, n. 8, p. 1332-1336, 2014.
47. SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª Ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2000.
48. LEANE, M. M. et al. **Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms**. International Journal of Pharmaceutics, v. 271, n. 1, p. 241-249, 2004.
49. XU, Y., DU, Y., **Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles**, International Journal of Pharmaceutics, v. 250, p. 215-226, 2003.
50. LAUS, R., LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O., FÁVERE, V. T., PEDROSA, R. C., BENASSI, J. C., GEREMIAS, R., **Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão**, Química Nova, v. 29, n.1, p. 34-39, 2006.
51. www.amano.com, Ficha técnica da lipase *Burkholderia cepacia*, acesso em 01/07/2016.

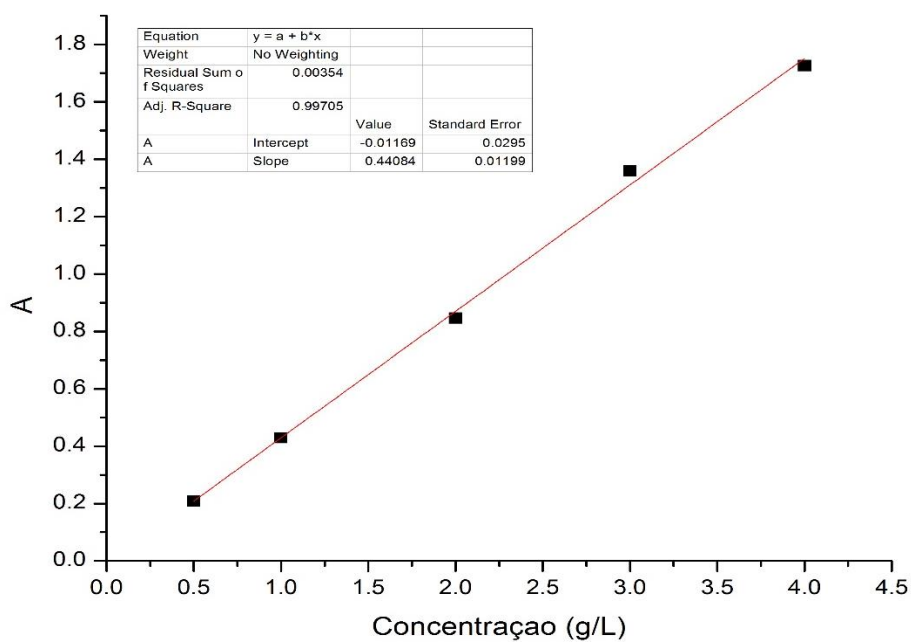
8. ANEXOS

ANEXO I – Curvas de calibração para as lipases F-AP15 e LPS-SD

(A) Lipase F-AP15

Tabela I: Dados de absorvância das soluções padrão de F-AP15.

Soluções-padrão	Concentração (g.L ⁻¹)	A
1	0,5	0,20827
2	1,0	0,42903
3	2,0	0,84662
4	3,0	1,35960
5	4,0	1,72690
6	5,0	1,97300

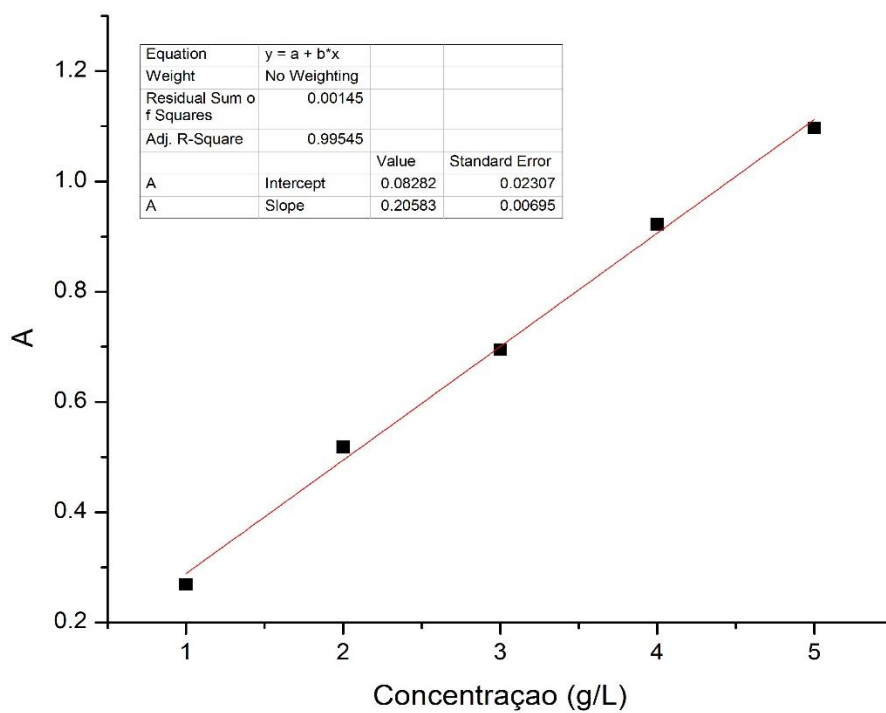


(B) Lipase LPS-SD

Tabela II: Dados de absorvância das soluções padrão de LPS-SD.

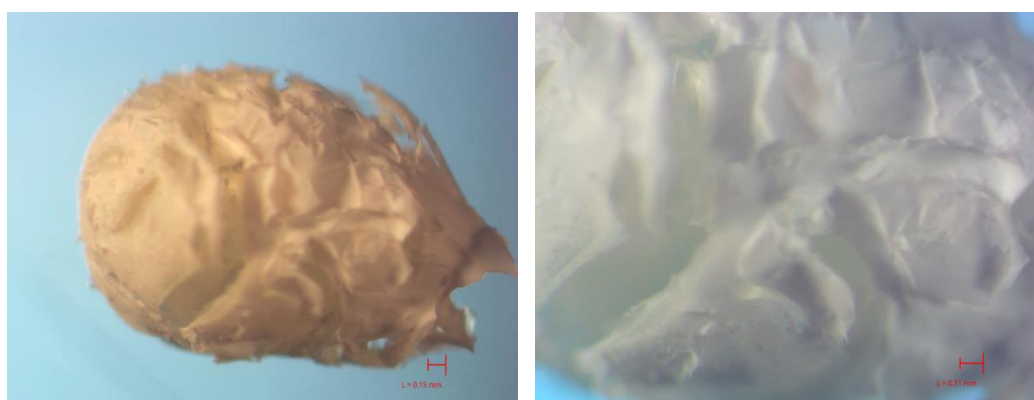
Soluções-padrão	Concentração (g.L ⁻¹)	A
1	1,0	0,26953
2	2,0	0,51845
3	3,0	0,69463
4	4,0	0,92200

5	5,0	1,09690
---	-----	---------

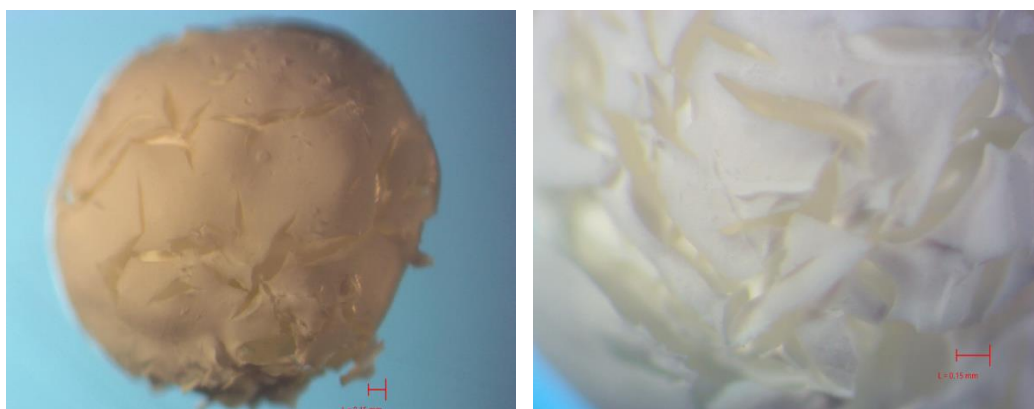


ANEXO II – Imagens adicionais das microesferas de quitosana úmidas (Microscópio ótico)

(A) Microesferas de quitosana úmidas reticuladas por 6h com glutaraldeído 1,25%

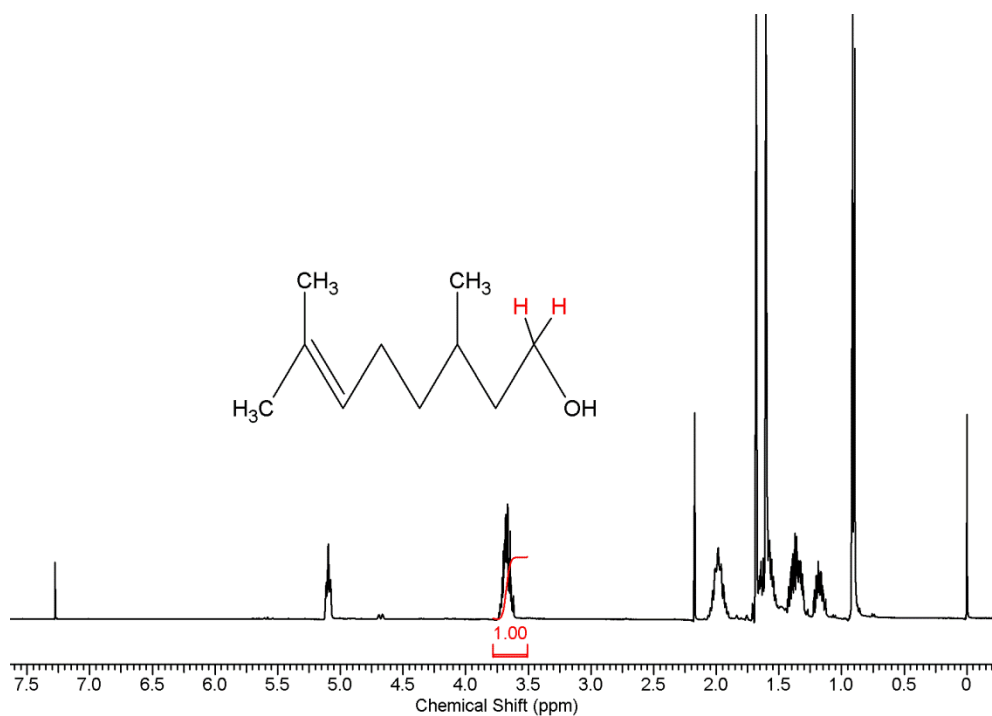


(B) Microesferas de quitosana úmidas reticuladas por 6h com glutaraldeído 5,0%



ANEXO III – Espectros de RMN-¹H do citrônol e acetato de citrônéia como o citrônol (CDCl₃, 400 MHz)

(A) Citrônol



(B) Acetato de citroneíla + citrônolol (conversão: 14%)

